

# $^{68}\text{Ga}$ - ja $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontamenetelmien kehitys

PRO GRADU -TUTKIELMA

Benjamin salo

Helsingin Yliopisto

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Radiokemian laboratorio

Kesäkuu 2018

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree programme Kemian koulutusohjelma
Tekijä – Författare – Author Benjamin Salo		
Työn nimi – Arbetets titel – Title <sup>68</sup> Ga - ja <sup>177</sup> Lu -radiolääkkeiden laadunvalvontamenetelmien kehitys		
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika – Datum – Month and year Kesäkuu 2018	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 65
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p><sup>68</sup>Ga- ja <sup>177</sup>Lu-radiolääkkeitä käytetään isotooppilääketieteessä. <sup>68</sup>Ga-radiolääkkeet ovat diagnostisia aineita, joita käytetään neuroendokriinisyövän ja eturauhassyövän diagnostiikassa. <sup>177</sup>Lu-radiolääkkeet ovat terapeuttisia aineita, joilla voidaan hoitaa <sup>68</sup>Ga-merkkiaineilla diagnosoituja syöpiä. <sup>68</sup>Ga-isotooppi on melko lyhytikäinen (t<sub>1/2</sub>=68 min) positroniemitteri, jota valmistetaan <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generaattorilla. <sup>177</sup>Lu-isotooppi on lyhyen kantaman beetasäteilijä, jonka hajoamisessa muodostuu beetasäteilyn lisäksi myös kuvantamiseen käytettävää gammasäteilyä. <sup>177</sup>Lu-radiolääkkeiden terapeuttinen käyttö perustuu siihen, että peptidi kuljettaa lääkeaineen oikeaan kohteeseen ja beetasäteily tuhoaa siellä syöpäsoluja.</p> <p>Radiolääkkeille tehdään valmistuksen jälkeen, ennen potilaalle antamista, laadunvalvonta, jossa määritetään radiolääkkeen puhtaus ensisijaisesti kromatografisilla menetelmillä. Radioaktiivisten aineiden hajoamisen, lääkeaineiden korkeiden laatuvaatimusten ja potilasturvallisuuden takia laadunvalvontamenetelmien tulee olla tarkkoja, nopeita ja luotettavia.</p> <p>Tämän tutkimuksen keskeisessä asemassa olivat <sup>68</sup>Ga- ja <sup>177</sup>Lu-radiolääkkeiden laadunvalvonnassa käytettävien ohutkerroskromatografia-(TLC) ja korkean erotuskyvyn kromatografia-(HPLC)menetelmien kehittäminen. Tutkimuksessa kehitettiin HPLC-menetelmä [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617:n laadunvalvontaa varten ja menetelmällä tehtiin massakvantitoiminen PSMA-617-lähtöaineelle. [<sup>177</sup>Lu]Lu-DOTATOC:n, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTANOC:n ja [<sup>68</sup>Ga]Ga -PSMA:n laadunvalvonnassa käytettyjä TLC-menetelmiä yhtenäistettiin ajoliuosten suhteen sekä optimoitiin TLC-menetelmissä käytettäviä skannausnopeuksia ja -jännitteitä. Lisäksi tutkittiin rauta(III)kontaminaatioiden vaikutusta <sup>177</sup>Lu- ja <sup>68</sup>Ga-radiolääkkeiden retentioaikoihin HPLC-menetelmässä.</p> <p>[<sup>177</sup>Lu]Lu -PSMA-617:n HPLC-menetelmällä saatiin 7,4 minuutin retentioajalla lähes symmetrinen piikki ja PSMA-617:n massakvantitoinnissa saatiin lineaarinen suora 0,9978 korrelaatiokertoimella. 1M ammoniumasetaatti-MeOH-liuoksen todettiin sopivan [<sup>177</sup>Lu]Lu -DOTATOC:n, [<sup>68</sup>Ga]Ga -DOTANOC:n ja [<sup>68</sup>Ga]Ga -PSMA:n laadunvalvonnan TLC-menetelmiin. Skannausnopeus 1 mm/s ja skannausjännite 900 V olivat optimiasetukset TLC- menetelmässä, kun käsiteltiin tuoreita radiolääkkeitä ja raudan havaittiin kasvattavan lääkeaineen retentioaikaa HPLC-menetelmässä.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords gallium-68, lutetium-177, PSMA, DOTANOC, DOTATOC, laadunvalvonta		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
E-thesis		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

## Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	1
Lyhenteet .....	4
1. Johdanto.....	5
2. Isotooppidiagnostiikka ja -hoidot .....	6
2.1 Diagnostiikassa ja hoidossa käytetyt peptidit ja kelaatit .....	7
2.1.1 DOTANOC ja DOTATOC .....	9
2.1.2 PSMA-11 ja PSMA-617 .....	11
2.2 Diagnostiikassa ja hoidossa käytetyt radionuklidit .....	13
2.2.1 Gallium-68:n ominaisuudet ja valmistus .....	13
2.2.2 <sup>68</sup> Ga-leimaukset .....	15
2.2.3 Lutetium-177:n ominaisuudet .....	17
2.2.4 Lutetium-177:n ja [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA:n valmistus .....	19
2.3 [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA eturauhassyövän hoidossa .....	21
3. Radiolääkkeiden laadunvalvonta .....	22
3.1 Ohutkerroskromatografia (TLC).....	25
3.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC) .....	28
3.3 [ <sup>177</sup> Lu]Lu -PSMA:n laadunvalvontamenetelmät .....	29
3.4 Metallikontaminaatiot .....	30
4. Kokeellisen työn tarkoitus .....	32
5. Reagenssit ja laitteisto .....	33
6. Menetelmät.....	36
6.1 <sup>177</sup> Lu- ja <sup>68</sup> Ga-radiolääkkeiden laadunvalvontamenetelmät .....	36
6.1.1 HPLC-menetelmä [ <sup>177</sup> Lu]Lu -PSMA-617:lle.....	36
6.1.2 PSMA-617:n massakvantitointi HPLC-menetelmällä.....	38
6.1.3 Lutetium-177:n gammaspektri .....	39
6.1.4 TLC-menetelmän yhtenäistäminen <sup>177</sup> Lu- ja <sup>68</sup> Ga-radiolääkkeille.....	39
6.2 Metallikontaminaatiot .....	43
6.2.1 Rauta(III)kontaminaation vaikutus radiolääkkeiden retentioaikaan .....	43

<b>7. Tulokset</b> .....	<b>45</b>
<b>7.1 <sup>177</sup>Lu- ja <sup>68</sup>Ga-radiolääkkeiden laadunvalvontamenetelmät</b> .....	<b>45</b>
7.1.1 HPLC-menetelmä [ <sup>177</sup> Lu]Lu -PSMA:lle.....	45
7.1.2 PSMA-617:n massakvantitointi .....	46
7.1.3 Lutetium-177:n gammaspektri .....	47
7.1.4 TLC-menetelmän yhtenäistäminen <sup>177</sup> Lu- ja <sup>68</sup> Ga-radiolääkkeille.....	48
7.1.4.1 TLC-levyn skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutus.....	48
7.1.4.2 Ajoliuoksen vahvuuden vaikutus .....	51
7.1.4.3 ROTOP QC iTLC –kitin toimivuus .....	53
<b>7.2 Metallikontaminaatiot</b> .....	<b>55</b>
7.2.1 Rauta(III)kontaminaation vaikutus radiolääkkeiden retentioaikaan.....	55
<b>8. Pohdinta ja johtopäätökset</b> .....	<b>57</b>
<b>9. Kirjallisuus</b> .....	<b>60</b>
<b>10. Liitteet</b> .....	<b>65</b>

## **Lyhenteet**

PSMA = prostate-specific membrane antigen = prostataspesifinen membraaniantigeeni

HPLC = high performance liquid chromatography = korkean erotuskyvyn nestekromatografia

TLC = thinlayer chromatography = ohutkerroskromatografia

DOTA = teraksetaani = 1,4,7,10-tetra-atsasyklododekaani-tetraetikkahappo

DTPA = dietyleenitriamiinipentaetikkahappo

-NOC = -3-(1-naftyyli)alaniini-oktreotidi

-TOC = -3-tyrosyyli-oktreotidi

Oktreotidi = D-fenyylialanyyli-L-kysteinyyli-D-tryptofanyyli-L-lysyli-L-treonyyli-N-(2-hydroksi -1-(hydroksimetyyli) propyyli)-syklinen(2-7)disulfidi

-HBED = N,N'-bis-[2-hydroksibentsyyli]etyleenidiamiini-N,N'-dietikkahappo

PET = Positron emission tomography = Positroniemissiotomografia

SPECT = Single-photon emission computed tomography = Yksifotoniemissiotomografia

GMP = good manufacturing practice = lääkkeiden hyvät tuotantotavat

PC = paper chromatography = paperikromatografia

S/N = signal to noise ratio = signaali-kohina-suhde

## **1. Johdanto**

$^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeitä käytetään toisiaan täydentäen niin sanotussa teranostiikassa (theranostics), jossa yhdistyvät sairauksien diagnostiikka ja hoito.  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeet ovat sairauksien, kuten syövän, diagnostiikassa käytettyjä positronisäteileviä merkkiaineita, joita kuvannetaan PET-laitteilla. Neuroendokriinisten kasvainten kuvantamisessa käytetään [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOC-radiolääkettä, ja eturauhaskasvainten kuvantamisessa käytetään [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-radiolääkettä.  $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeet ovat beetasäteileviä terapeuttisia lääkeaineita, joita voidaan käyttää  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeillä tehdyn diagnostiikan jälkeen sairauksien hoidossa.  $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeet tuhoavat kohdesoluja beetasäteilyllä, mutta lutetium-177 lähettää myös gammasäteilyä, joka mahdollistaa kuvantamisen hoidon yhteydessä. Neuroendokriinisyövän hoidossa käytettäviä peptidejä ovat esimerkiksi [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATOC ja [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATATE, kun taas eturauhassyövän hoidossa käytetään [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617-radiolääkettä.

Radiolääkkeiden valmistuksessa noudatetaan muun lääketeollisuuden tavoin GMP-ohjeita (Good Manufacturing Practice), jotta saavutetaan riittävä laatutaso ja potilasturvallisuus. GMP-ohjeiden noudattamista Euroopassa valvoo Euroopan lääkevirasto eli EMEA ja Suomessa lääkevalvonnasta vastaa FIMEA, joka on osa Euroopan lääkevalvonnan viranomaisverkostoa. GMP-ohjeet sisältävät perusteet kvalifiointiin ja validointiin tuotantotiloille, työvälineille, valmistusprosesseille, laadunvalvonnalle ja muihin tuotantotapoihin. GMP-ohjeiden avulla suunnitellaan laadunvalvonta, joka tehdään radiolääkkeille valmistuksen jälkeen, ennen potilaalle antamista. Laadunvalvonnassa määritetään radiolääkkeen puhtaus ensisijaisesti kromatografisilla menetelmillä. Koska radioaktiivinen aine hajoaa, lääkeaineiden laatuvaatimukset ovat korkeat ja potilasturvallisuus on ehdotonta, tulee laadunvalvontamenetelmien olla mahdollisimman nopeita, tarkkoja ja luotettavia.

Tutkimuksen kokeellinen osuus suoritettiin HUS-Kuvantamisen yksikössä Meilahden sairaalan isotooppilaboratoriossa. Tavoitteena oli yhdenmukaistaa ja optimoida HUS-kuvantamisessa käytettävien  $^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontaa sekä kehittää sopiva HPLC-menetelmä [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA:n omatuotannon laadunvalvontaa varten.

Tutkimuksessa selvitettiin voiko  $^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvonnan TLC-menetelmissä käyttää samoja ajoliuoksia, ja optimoitiin TLC-menetelmien analytiikkaa. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA:n radiokemiallisen puhtauden määrittämistä varten kehitettiin HPLC-menetelmä testaamalla erilaisia liuosgradientteja käyttäen [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA- ja PSMA-617-näytteitä.

## **2. Isotooppidiagnostiikka ja -hoidot**

Isotooppilääketieteeseen kuuluvat radioaktiivisilla lääkeaineilla tehtävä diagnostiikka ja hoidot. Isotooppidiagnostiikassa ja -hoidoissa annetaan radioaktiivinen merkkiaine potilaalle sisäisesti radiolääkkeen muodossa. Radiolääke voidaan antaa joko suun kautta, suonensisäisesti tai suoraan injektiona kohteeseen, kuten kasvaimeen. Koska kyseessä on radioaktiivinen avolähde, on riski kontaminaatioihin ja haitallisiin säteilyannoksiin suurempi kuin sädehoidon kanssa. Isotooppilääketieteen haasteita diagnostiikassa ja hoidoissa ovat muun muassa sopivien radioisotooppien saatavuus, säteilyn biologiset vaikutukset elimistössä sekä kantajamolekyylin pysyvyys, sitoutumisen spesifisyys ja yhteensopivuus radioisotoopin kanssa.<sup>1</sup>

Isotooppidiagnostiikassa radiolääkkeet jakautuvat elimistöön lääkeaineen molekyylirakenteesta riippuen ja niiden kohteestaan lähettämä säteily havaitaan kuvantamislaitteen säteilyilmaisimella. Kuvantamisen avulla voidaan tutkia erilaisia aineenvaihdunnan muutoksia ja elinten toiminnan muutoksia sekä diagnosoida sairauksia. Potilaan saama säteilyannos minimoidaan diagnostiikassa mahdollisimman pieneksi, minkä mahdollistavat herkät mittalaitteet ja laadukkaat radiolääkkeet. Isotooppihoidoissa säteilyannokset ovat huomattavasti suuremmat kuin diagnostiikassa, koska säteilyn on tarkoitus vuorovaikuttaa kohdesolujen kanssa. Isotooppihoitoja käytetään yleisesti syövän, kilpirauhassairauksien ja niveltulehdusten hoidossa.<sup>2,3</sup>

Niin sanotussa teranostiikassa (theranostics) yhdistyvät sairauksien diagnostiikka ja hoito. Teranostiikassa sairautta varten tarkasti kohdennetut molekyylit, kuten peptidit, leimataan vuorollaan diagnostiikkaan ja hoitoon tarkoitetuilla radionuklideilla. Näin sairaus voidaan ensin diagnosoida ja sen jälkeen hoitaa käyttämällä samaa kantaja-ainetta eri radionuklidien kanssa.  $^{68}\text{Ga}$ - ja  $^{177}\text{Lu}$ -isotoopit ovat yleisesti tunnettuja teranostiikassa.

<sup>68</sup>Ga-leimattulla kantaja-aineella tehdään diagnosointi ja muut kuvantamiset, ja <sup>177</sup>Lu-leimatulla kantaja-aineella tehdään sekä kuvantamista että hoitoja.<sup>4</sup>

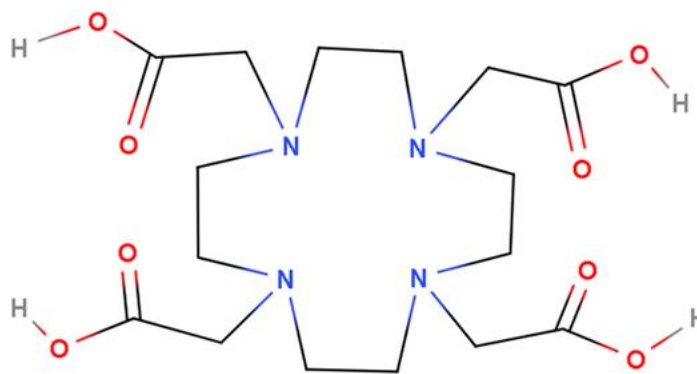
## 2.1 Diagnostiikassa ja hoidoissa käytetyt peptidit ja kelaatit.

Radiolääkkeiden kehittämisessä on muun lääketieteen tavoin kiinnostuttu entistä enemmän peptidien hyödyntämisestä, koska niiden luontaiset ominaisuudet luovat pohjan lukuisille mahdollisuuksille lääkesuunnittelussa. Ihmiskehon peptidejä tunnetaan yli 7000 ja niiden tehtävät ihmisen fysiologiassa ovat erittäin laaja-alaisia. Peptidit toimivat muun muassa hormoneina, kasvutekijöinä, hermoston välittäjäaineina, ionikanavien ligandeina ja säätelevät metaboliaa ja elimistön homeostaasia. Peptidien toiminnalle on tyypillistä, että ne kiinnittyvät spesifisti solun pinnan reseptoreihin ja aiheuttavat solunsisäisen vasteen. Tämä mahdollistaa myös lääkeaineiden kuljettamisen kohdekudoksiin.<sup>5–7</sup>

Peptidejä käytetään terapeuttisissa lääkeaineissa jo lääketieteen monilla osa-alueilla, kuten neurologiassa, endokrinologiassa ja hematologiassa, mutta peptidien käyttöön liittyy myös haasteita. Luonnolliset peptidit ovat kemiallisesti reaktiivisia, melko helposti hajoavia yhdisteitä ja ne poistuvat verenkierrosta nopeasti, jolloin niiden vaikutusaika pienenee. Tämän takia luonnollisten peptidien sijaan valmistetaan samankaltaisia, mutta biologisesti stabiilimpia peptidejä, joiden aminohapposekvenssi ei ole yhtä altis isomerisaatiolle, hydrolyysille, hapettumiselle tai glykosylaatiolle.<sup>6,8</sup>

Radiolääkkeiden kannalta on oleellista, että peptidiin saadaan liitettyä haluttu radionuklidi. Radionuklidien kiinnittämiseen käytetään usein bifunktionaalista kelatoivaa ryhmää, joka kiinnittyy kovalenttisesti peptidiin ja sitoo radionuklidin koordinaatiosidosten avulla. <sup>68</sup>Ga- ja <sup>177</sup>Lu-radiolääkkeissä eniten käytetty kelatoiva ryhmä on tetraksetaani eli DOTA, joka on esitetty kuvassa 1.<sup>9–12</sup>





**Kuva 1. Kelatoiva ryhmä tetraksetaani eli DOTA.**

DOTA-ryhmä konjugoituu peptidin N-terminaaliseen aminoryhmään ja sitoo radioisotoopin kuudella koordinaatiosidoksella, joissa amiini- ja karboksylaattiryhmät luovuttavat elektroneja sidoksiin. Muodostunut kompleksi stabiloi radioisotooppia ja estää mm. gallium-68:n kohdalla hydroksyloitumista. Gallium-68:lla on lisäksi melko lyhyt puoliintumisaika, joten kelatoitumisen tulisi tapahtua nopeasti. DOTA-ryhmän leimaamisessa on aiemmin käytetty melko pitkiä jopa 30 minuutin inkuboimisaikoja, mutta nykyään leimaamisen pystyy tekemään viidessä minuutissa. Leimauksessa käytettävät lämpötilat on kuitenkin korkeita, mikä rajoittaa joidenkin peptidien käyttämistä. DOTA-ryhmää käytetään paljon  $^{68}\text{Ga}$ - ja  $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeissä neuroendokriini- ja eturauhassyövän diagnostiikassa ja hoidoissa. Kelatoivalle ryhmälle on kuitenkin monia vaihtoehtoja. Gallium-68:n kanssa käytettävistä vaihtoehtoisista kelatoivista ryhmistä suurin osa on kuusihamppaisia, mutta myös viisihamppaisilla ja nelihamppaisilla kelatoivilla ryhmillä on saatu muodostettua pysyviä komplekseja. Kuusihamppaisista kelatoivista ryhmistä erittäin pysyviä komplekseja on saatu merkaptamino-ligandeilla, HBED-CC:llä, triatsa-trietikkahapolla (NOTA) sekä erilaisilla NOTA-johdannaisilla (TRAP-H, TRAP-Ph, TRAP-OH).<sup>13,14</sup> Viisi- ja nelihamppaisista kelatoivista ryhmistä stabiileimmat  $\text{Ga}^{3+}$ -kompleksit on saatu käyttäen merkaptamino-ligandeja. Taulukossa 1 on esitetty DOTA- ja NOTA-ryhmien sekä useamman merkaptamino-ligandin muodostamien  $\text{Ga}^{3+}$ -kompleksien tasapainovakiot.<sup>14</sup>

**Taulukko 1.** Ga<sup>3+</sup>-kompleksien tasapainovakiota DOTA- ja NOTA-ryhmien sekä useamman merkaptamino-ligandin kanssa (25 °C, 0,1M KNO<sub>3</sub> tai KCl).<sup>14</sup>

Tasapainovakio	4SS	5SS	6SS	EDDASS	EC	TACN-TM	NOTA	NS3	DOTA
$\frac{[ML]}{[M][L]}$	24,73	27,73	41,0	35,6	31,5	34,2	30,98	20,5	21,33
pM	22,6	22,1	31,6	29,0	24,7	23,6	26,4	-	-

Siitä huolimatta, että Ga-DOTA-kompleksilla on pienempi termodynaamista stabiiliutta kuvaava tasapainovakio, kuin useammalla taulukon 1 muista komplekseista, on Ga-DOTA-peptideillä havaittu erittäin korkeaa affiniteettia syöpäsoluihin, suotuisaa farmakokinetiikkaa ja erinomaista stabiiliutta in vivo- ja in vitro-olosuhteissa.<sup>11,14</sup> DOTA-ryhmää hyödynnetään myös eturauhassyövän kuvantamisessa ja hoidoissa käytetyissä PSMA-ligandeissa, joista kerrotaan tarkemmin kohdassa 2.1.2.

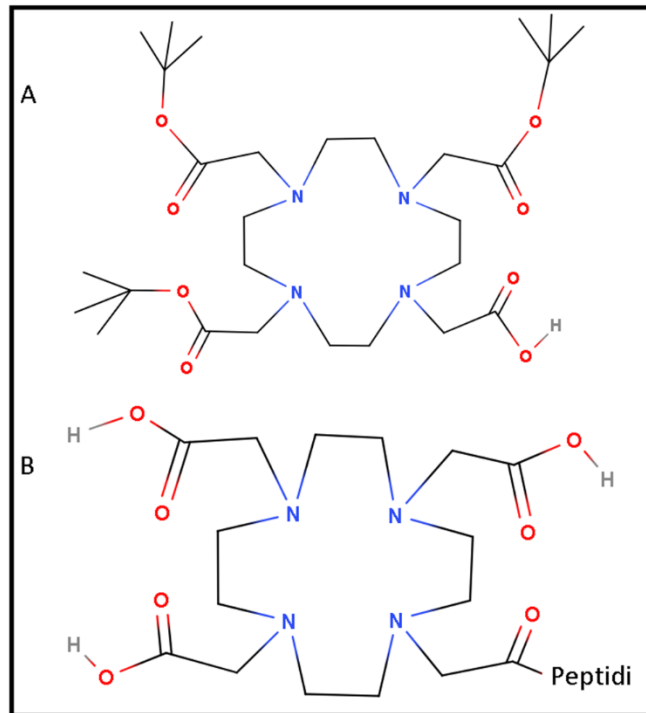
Lutetium-177 on Gallium-68:n tavoin kolmenarvoinen metalli (+III), mutta atomirakenteeltansa huomattavasti raskaampi. Kirjallisuudessa esiintyviä <sup>177</sup>Lu-isotoopille sopivia kelatoivia ryhmiä ovat DOTA:n lisäksi muun muassa DTPA (dietyleenitriamiinipentaetikkahappo)<sup>15,16</sup>, 5p-C-NETA ((2-({1-[4,7-bis(karboksimetyyli)-1,4,7-triatsanonan-1-yyli]-7-(4-nitrofenyyli)heptan-2-yyli}(karboksimetyyli)amino)etaanihappo)<sup>17</sup> ja triatsoliryhmän sisältävä asyklinen H<sub>2</sub>azapa<sup>18</sup>. DTPA:n on havaittu toimivan DOTA-ryhmää paremmin silloin, kun Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> tai Fe<sup>2+</sup> ovat Lu<sup>3+</sup>:n kanssa kilpailevia metalleja.<sup>16</sup> 5p-C-NETA:n muodostamaa kompleksia lutetium-177:n sekä yttrium-90:n kanssa pidetään myös lupaavana, koska kompleksi on erittäin stabiili ja soveltuu käytettäväksi erilaisiin radiolääkeaineisiin<sup>17</sup>. H<sub>2</sub>azapa:n vahvuudet liittyvät puolestaan siihen, että se pystyy muodostamaan jopa kahdeksan koordinaatiosidosta ja kompleksoitumaan lutetium-177:n sekä kupari-64:n, gallium-67:n ja indium-111:n kanssa<sup>18</sup>.

### 2.1.1 DOTANOC ja DOTATOC

G-proteiinivälitteisten somatostatiinireseptoreiden runsas ilmentyminen on havaittu olevan yleistä neuroendokriinisissä syöpäsoluissa ja tämä on avannut mahdollisuuksia

syövän diagnosointi- ja hoitomenetelmiin. DOTANOC ja DOTATOC ovat syntetisoituja somatostatiini-välittäjäaineen analogeja, joissa kelatoiva ryhmä DOTA on liitetty reseptorille spesifiseen peptidiin.<sup>19</sup>

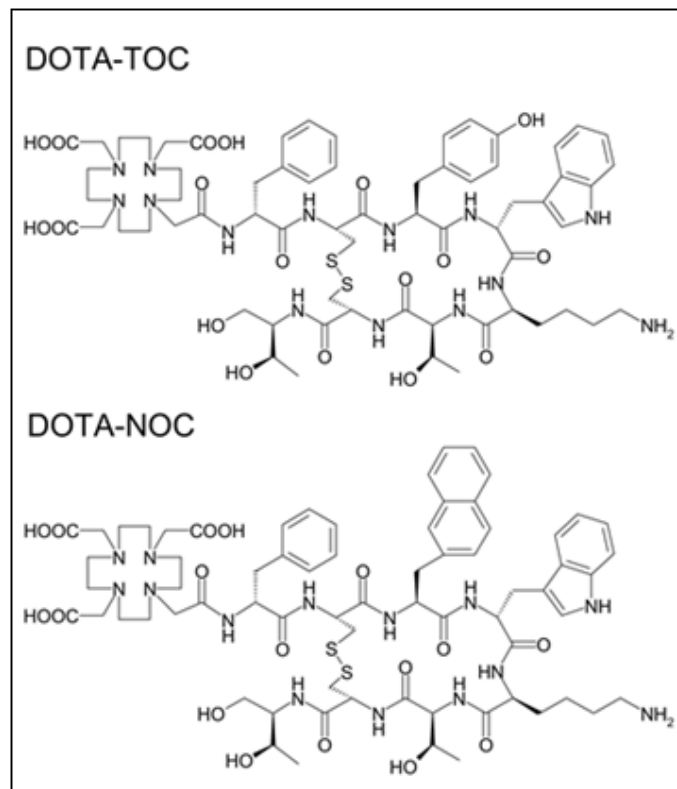
DOTA-peptideissä lähtöaineena käytetään suojattua kelatoivaa ryhmää DOTA(tBu)<sub>3</sub>, jossa DOTA:n kolme karboksyyli ryhmää on suojattu tertiäärisellä butyyllillä.<sup>10</sup> Kuvassa 2 on esitetty peptidin liittyminen DOTA(tBu)<sub>3</sub>-kelatoivaan ryhmään.



**Kuva 2. DOTA-peptidin valmistus. (a) DOTA-tri-t-butyylesteri. (b) Konjugoitunut DOTA-peptidi.**

Somatostatiini, jota DOTANOC ja DOTATOC jäljittelevät, on syklinen peptidihormoni, joka esiintyy luonnollisesti kahdessa muodossa: 14 aminohapon pituisena (SS-14) ja 28 aminohapon pituisena (SS-28). Somatostatiini kiinnittyy G-proteiinivälitteisiin somatostatiinireseptoreihin, joita on viittä alatyyppeä (sstr1-5) erilaisia soluvasteita varten. Somatostatiinin käyttäminen radiolääkkeiden kantajamolekyylinä ei ole kuitenkaan mahdollista somatostatiinin lyhyen plasmapuoliintumisajan takia.<sup>20,21</sup> Sen sijaan käytetään DOTANOCia ja DOTATOCia, joiden eroavaisuuksista oleellisinta on niiden sitoutuminen somatostatiinireseptoreiden alatyyppeihin. Molemmat yhdisteet sitoutuvat alatyyppeihin sstr2 ja sstr5, mutta DOTANOC sitoutuu myös alatyyppeihin sstr3.<sup>22</sup> Neuroendokriinisyöpien ilmenemisessä on ollut eroja reseptorialatyyppeiden suhteessa, mikä antaa DOTANOCille

lähtökohtaisesti hieman paremman aseman. Yleisin reseptorialatyyppe on kuitenkin  $sstr2$ .<sup>23</sup> Molekyyliarakenteeltansa DOTANOC ja DOTATOC eroavat yhden aminohapon suhteen: DOTANOCilla on yhdessä sivuketjussa 1-naftyyli-alaniini, kun taas DOTATOCilla kyseisessä sivuketjussa on tyrosiini. Yhdisteiden rakenteet on esitetty kuvassa 3. DOTANOC ja DOTATOC voidaan leimata erilaisilla kolmenarvoisilla radionuklideilla, kuten  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ,  $^{111}\text{In}^{3+}$  tai  $^{90}\text{Y}^{3+}$ .<sup>10,20,24</sup>  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ :n sitoutumisen DOTA-peptidiin on havaittu jopa lisäävän yhdisteen reseptoriaffiniteettia.<sup>22</sup>



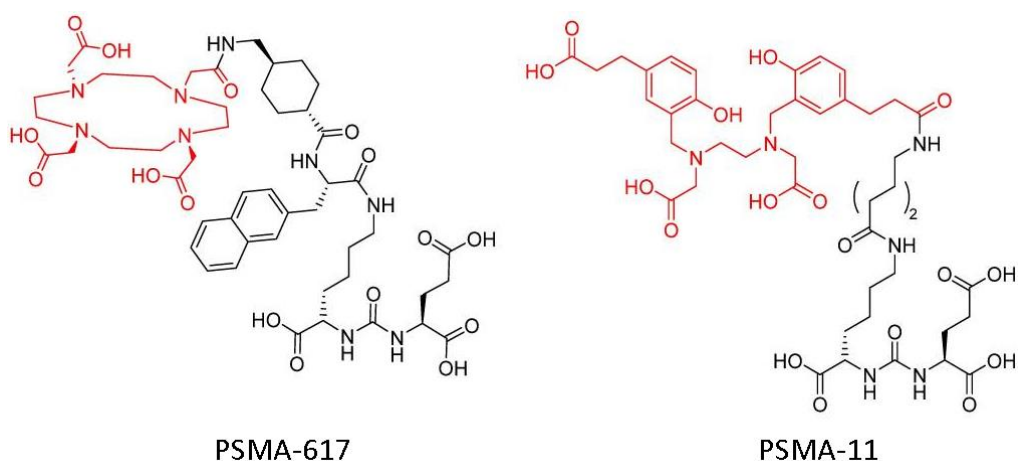
Kuva 3. DOTATOC ja DOTANOC molekyyliarakenteet. Uudelleenjulkaistu luvalla (Elsevier, 2018) lähteestä Breeman, W. A. P.; de Blois, E.; Sze Chan, H.; Konijnenberg, M.; Kwekkeboom, D. J.; Krenning, E. P.  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled DOTA-Peptides and  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives. *Semin. Nucl. Med.* 2011, 41 (4), 314–321.<sup>11</sup>

### 2.1.2 PSMA-11 ja PSMA-617

Prostata spesifinen membraaniantigeeni eli PSMA on solukalvon läpäisevä proteiini, jota esiintyy erityisesti eturauhasen syöpäsoluissa.<sup>25,26</sup> PSMA-proteiini on tästä syystä hyvä kohde eturauhassyöpään liittyvässä lääkekehityksessä ja useita PSMA-ligandeja on

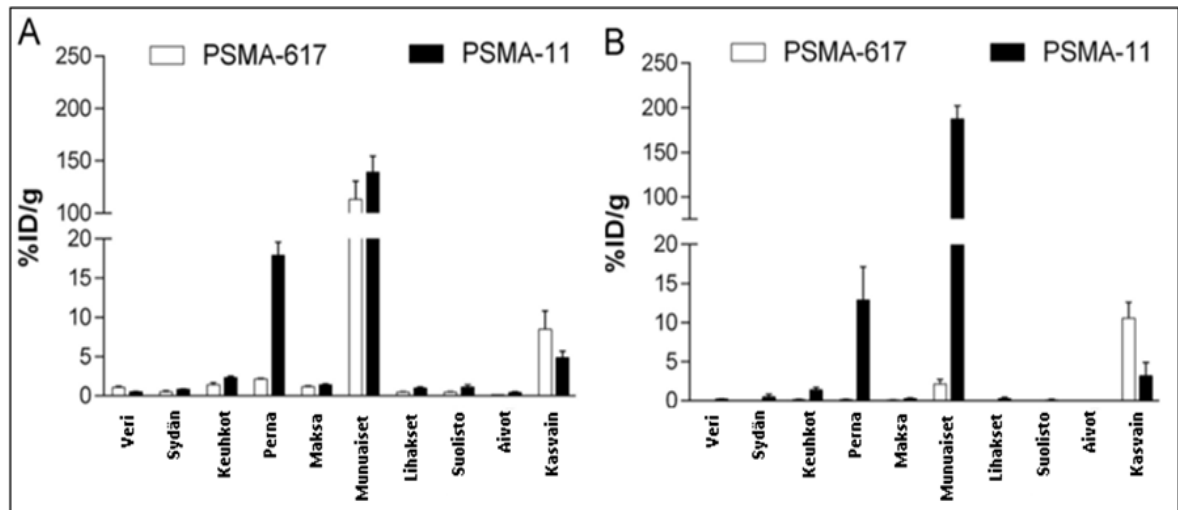
kehitetty jo parin kymmenen vuoden ajan.<sup>25</sup> PSMA-ligandeista tutkituin ja käytetyin on PSMA-11, joka tunnetaan myös nimillä PSMA-HBED-CC, PSMA-HBED, Glu-CO-Lys(Ahx)-HBED-CC, DKFZ-PSMA-11 ja Prostamedix.<sup>25,27</sup> PSMA-11-ligandin on todettu sitoutuvan korkealla affiniteetilla syöpäsoluihin ja pääsevän myös tehokkaasti niiden sisälle.<sup>25,28</sup> PSMA-11 sisältää glutamiinihappo-urea-rungon ja siihen on liittynään kelatoiva ryhmä HBED-CC (N,N'-bis-[2-hydroksibentsyyli]etyleenidiamiini-N,N'-dietikkahappo).<sup>29</sup> HBED-CC-ryhmä muodostaa karboksyyli-, hydroksyyli- ja amiiniryhmien avulla kuusi koordinaatiosidosta gallium-68:n kanssa. HBED-CC:n rakenne on asyklinen ja siinä on yksi ylimääräinen karboksyyli-ryhmä, joka ei osallistu <sup>68</sup>Ga-kompleksin muodostumiseen ja sen avulla voidaan sitoa haluttu peptidi. Radioleimauksia on tehty elektronisieppaajalla (<sup>67</sup>Ga) ja positroniemittäreillä (<sup>68</sup>Ga, Al<sup>18</sup>F).<sup>30,31</sup>

PSMA-11-ligandin jälkeen löydetty pienimolekyylinen PSMA-ligandi, PSMA-617, on myös osoittautunut erinomaiseksi kantaja-aineeksi syöpäsoluihin sitoutumisensa ja sisäänpääsyn vuoksi. PSMA-617 koostuu samasta glutamiinihappo-urea-rungosta, mutta siihen on lipofiilisen linkkimolekyylin avulla liitetty kelatoiva ryhmä DOTA.<sup>9</sup> PSMA-617:n DOTA-ryhmä voidaan leimata eri käyttötarkoituksiin käyttäen positroniemittäreitä (<sup>44</sup>Sc, <sup>68</sup>Ga), gammaemittäreitä (<sup>111</sup>In), beetaemittäreitä (<sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu) tai alfaemittäreitä (<sup>213</sup>Bi, <sup>225</sup>Ac).<sup>25,26</sup> PSMA-11:n ja PSMA-617:n molekyyliarakenteet on esitetty kuvassa 4.<sup>32</sup>



**Kuva 4. PSMA-11 ja PSMA-617 molekyyliarakenteet. Kelatoivat ryhmät DOTA (PSMA-617) ja HBED-CC (PSMA-11) on merkattu punaisella. Uudelleenjulkaistu lähteestä Eppard E, de la Fuente A, Benešová M, et al. Clinical Translation and First In-Human Use of [<sup>44</sup>Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Theranostics*. 2017;7(18):4359-4369. Lisenssi: CC BY-NC.<sup>32</sup>**

PSMA-617-ligandilla on saatu tuloksia, että se kohdentuisi edeltäviin PSMA-ligandeihin (PSMA-I&T ja PSMA-11) nähden jopa tarkemmin kasvaimiin. Tällöin muiden elinten saamat säteilyannokset pienentyisivät radiolääkeainekäytössä. Kuvassa 5 on esitetty PSMA-11- ja PSMA-617-ligandien jakautuma eri elimiin tunnin (A) ja 24 tunnin (B) kuluttua injektiosta.<sup>26</sup>

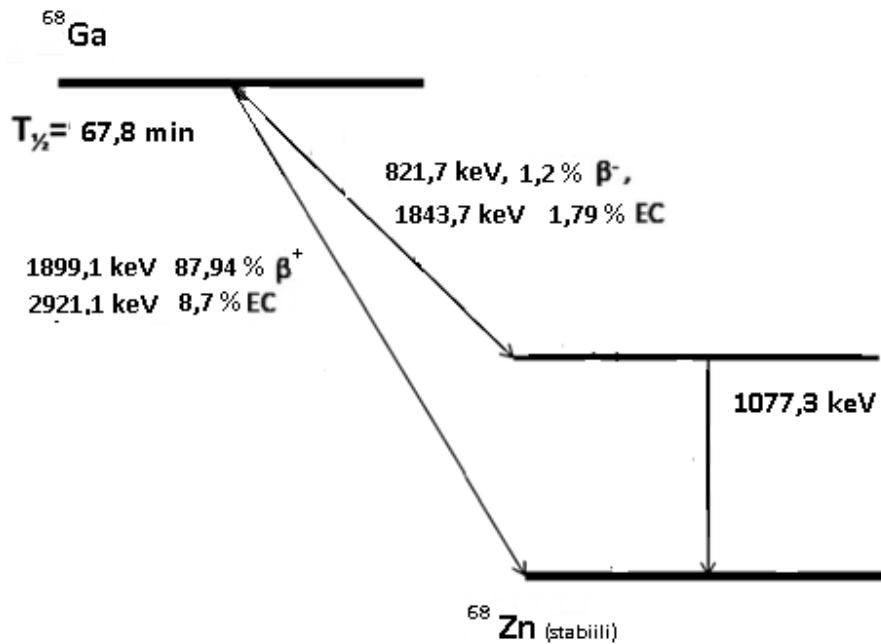


Kuva 5. PSMA-11- ja PSMA-617-ligandien jakautuminen eri elimiin tunnin (A) ja 24 tunnin (B) kuluttua injektiosta. Uudelleenjulkaistu luvalla (Elsevier, 2018) lähteestä Kratochwil, C.; Afshar-Oromieh, A.; Kopka, K.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L. Current Status of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeting in Nuclear Medicine: Clinical Translation of Chelator Containing Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands Into Diagnostics and Therapy for Prostate Cancer. *Semin. Nucl. Med.* 2016, 46 (5), 405–418<sup>26</sup>

## 2.2 Diagnostiikassa ja hoidoissa käytetyt radionuklidit

### 2.2.1 Gallium-68:n ominaisuudet ja valmistus

Gallium on ryhmän 13 metalli, jonka ainoa stabiili hapetusluku vesiliuoksessa on +3. Gallium voi esiintyä vesiliuoksessa pH-arvossa 3-7 hydrolysoituneena kolloidisessa muodossa  $\text{Ga}(\text{OH})_3$ , mutta fysiologisen pH:n yläpuolella se on lähes yksinomaan liukoissa  $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ -ioneina.<sup>33</sup> Galliumilla on kaksi radioisotooppia, jotka sopivat ominaisuuksiensa puolesta käytettäväksi radiolääkkeisiin: gallium-67 ja gallium-68.<sup>33</sup> Kuvassa 6 on esitetty gallium-68:n hajoamiskaavio.<sup>34</sup>



Kuva 6. Gallium-68:n yksinkertaistettu hajoamiskaavio tietokannan Table of Radionuclides tietojen perusteella.<sup>34</sup>

Gallium-67 tuotetaan syklotronilla ja se hajoaa 100 prosenttisesti elektronisieppauksella ( $t_{1/2} = 3,26 \text{ d}$ ). Gallium-68 on huomattavasti lyhytikäisempi isotooppi ( $t_{1/2} = 68 \text{ min}$ ). Se hajoaa positroniemissiolla, jossa syntyy annihilaation seurauksena 511 keV gammasäteilyä. Hajomaist tuotteena muodostuu stabiilia  $^{68}\text{Zn}$ -isotooppia. Gallium-68 valmistetaan syklotronin sijaan yleisimmin  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generaattorilla, joka mahdollistaa  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden valmistuksen paikoissa, missä syklotronia ei ole saatavilla. Generaattorissa emonuklidi germanium-68 ( $t_{1/2} = 275 \text{ d}$ ) hajoaa elektronisieppauksen kautta muodostaen  $^{68}\text{Ga}$ -isotooppia, joka voidaan eluoida ulos generaattorista. Gallium-68 on puoliintumisaikansa ja positroniemissionsa takia erinomainen isotooppi diagnostiikkaa varten, sillä PET-kuvantamisella saadaan kolmiulotteisia kuvia hyvällä resoluutiolla ja lyhyt puoliintumisaika vähentää potilaan säteilyannosta.<sup>33</sup> Gallium-68:n ominaisuuksia on esitetty taulukossa 2 muiden diagnostisten radionuklidien rinnalla.

**Taulukko 2. Diagnostiikassa käytettyjen radionuklidien puoliintumisajat ja keskimääräiset gammaenergiat.<sup>35</sup>**

Radionuklidi	<sup>99m</sup> Tc	<sup>201</sup> Tl	<sup>123</sup> I	<sup>18</sup> F	<sup>67</sup> Ga	<sup>111</sup> In	<sup>68</sup> Ga
γ <sub>avg</sub> -energia(keV)	125,90	57,83	156,04	511,00	142,58	264,48	511,00
Puoliintumisaika	6,01 h	2,8 d	13,2 h	109,9 min	3,261 d	2,8 d	67,8 min

### 2.2.2 <sup>68</sup>Ga- leimaukset

Gallium-68 eluoidaan <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-generaattorista mahdollisimman lähellä leimausajankohtaa lyhyen puoliintumisaikansa takia. Eluoimisesta kestää kahdeksan tuntia, kunnes generaattorissa <sup>68</sup>Ga:n muodostuminen ja hajoaminen ovat tasapainossa, ja tällöin <sup>68</sup>Ga-pitoisuus on maksimissaan. Generaattori on kuitenkin jo 68 minuutin jälkeen palautunut 50 prosenttiin tasapainoarvosta ja neljän tunnin päästä prosenttiosuus on 90 %.<sup>36</sup> Generaattorin eluoiminen osissa sekä anionin- ja kationinvaihto eluaatille ovat hyviä puhdistus-/konsentroitikeinoja <sup>68</sup>Ga-merkkiaineelle. Eluoimalla osissa on saatu <sup>68</sup>Ga-eluaattia, jossa 80 % eluoitavissa olevasta radioaktiivisuudesta oli 1 millilitrassa. Samalla ioniset epäpuhtaudet olivat niin vähäisiä, ettei muita puhdistustoimenpiteitä tarvittu.<sup>37</sup>

<sup>68</sup>Ga-leimaukset tehdään kelatoiviin ryhmiin, jotka on konjugoitu peptideihin. Gallium-68:lla leimattavia somatostatiinianalogeja ovat DOTA-peptidit, kuten DOTANOC, DOTATOC ja DOTATATE. Gallium-68:lla leimattavia PSMA-peptidejä ovat PSMA-11 ja PSMA I&T, joista jälkimmäisessä kelatoivana ryhmänä on DOTA-ryhmä. PSMA-11:ssa kelatoiva ryhmä on HBED-CC.

PET-kuvantamisessa käytettäviä DOTA-peptidejä voidaan leimata gallium-68:lla jopa 1 GBq/nmol molaariseen aktiivisuuteen. DOTATOCin ja DOTATATE:n radioleimauksissa DOTA-peptidit liuotetaan 0,01 M etikkahappoon, missä peptidikonsetraatioksi tulee 10<sup>-3</sup> M. Leimauksessa peptidi ja <sup>68</sup>Ga-merkkiaine sekoitetaan 1,25-2,5 M natriumasetaatin tai 1 M HEPES:in (4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiinietaani-sulfonihappo) kanssa.<sup>36,37</sup> Leimaus tehdään pH:ssa 3,5-4 tyypillisesti pienissä 50-150 µL tilavuuksissa. Reaktioastioina on kirjallisuudessa käytetty polypropeenisiä tai lasisia näytepulloja, jotka asetetaan leimauksessa lämpötilakontrolloituun hauteeseen ja pidetään 10 minuuttia 80 °C:ssa.



Radiolyysin estoon on käytetty etanolia ja askorbiinihappoa.<sup>36</sup> Tuote voidaan puhdistaa esimerkiksi kiinteäfaasiuutolla (SPE) käyttäen C-18 käänteisfaasipatruunaa sekä suodattaa steriilisuodattimella.<sup>37</sup> C-18 käänteisfaasipatruunoilla saadaan erotettua <sup>68</sup>Ga-peptidit <sup>68</sup>Ga-kolloideista, vapaista <sup>68</sup>Ga-ioneista ja asetaattikomplekseista, mikä kasvattaa radiokemiallista puhtautta.<sup>36,38</sup> Kolonni eluoidaan lopuksi etanolilla ja tuote laimennetaan suolaliuoksella lopuksi siten, että tuotteen etanolipitoisuudeksi jää <5 %.<sup>36</sup> Tuotteen vapaa gallium-68 voidaan sitoa EDTA:lla tai DTPA:lla, jotta se poistuu elimistöstä nopeasti. EDTA:n on kuitenkin havaittu sitoutuvan gallium-68:n kanssa paremmin kuin DTPA:n.<sup>37</sup>

HUS-kuvantamisessa käytetyt [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTANOC ja [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA valmistetaan Modular-Lab PharmTracer-nimisellä kasettipohjaisella synteesilaitteistolla, joka on esitetty kuvassa 7.<sup>39</sup>



**Kuva 7. Modular-lab PharmTracer -synteesilaitteisto.** Uudelleenjulkaistu luvalla lähteestä Laine J., Kuhmonen V., Lipponen T., Bergström K. Experience in Changing to Cassette System in Ga-68 DOTANOC Routine Radiosynthesis. Department of Clinical Physiology and Nuclear Medicine, Helsinki University Central Hospital, HUS Medical Imaging Center, EANM konferenssi, Göteborg 10.-22.10 2014.<sup>39</sup>

[<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTANOC valmistetaan synteasilaitteistolla käyttäen kertakäyttöistä C4-Ga68-PP-kasettia. Synteessissä <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-generaattori eluoidaan 0,1 M suolahapolla ja eluentti puhdistetaan kationinvaihtopatruunalla (Strata X-C). Gallium-68 eluoidaan kolonnista suolahappo-asetoni-liuoksella (0,02 N HCl, 98 % asetonia), minkä jälkeen eluentti johdetaan reaktioastiaan, jossa se reagoi veteen liuotetun DOTA-peptidin (1 mg/ml) kanssa (300 s, 85°C). Radioleimauksen puskuriliuoksena käytetään 2 mL natriumasetaattiliuosta (0,49 g natriumasetaattitrihydraattia, 0,939 ml väkevää etikkahappoa, laimennettuna 100 ml:ksi traceSelect-vedellä), jonka pH on 4. Reaktioseoksessa on myös 300 µL etanolia estämässä radiolyyysiä. Reaktiotuote puhdistetaan C-18-erotuspatruunalla ja eluoidaan 80 % etanoli-vesi-liuoksella (V/V).<sup>40</sup>

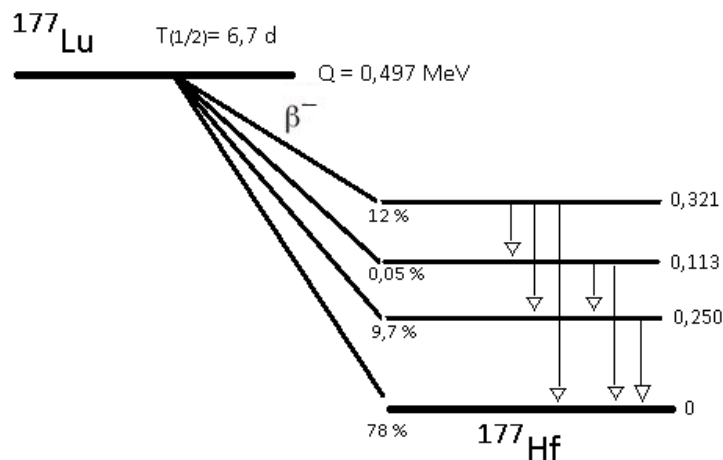
[<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA:n valmistuksessa käytetään kertakäyttöistä C4-GA68-PSMA-kasettia. <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-generaattori eluoidaan 0,1 M suolahapolla ja eluentti puhdistetaan kationinvaihtopatruunalla (SCX). <sup>68</sup>Ga-isotooppi eluoidaan patruunasta suolahappo-natriumkloridiliuoksella (5,5 M HCl - 5 M NaCl). PSMA-peptidi on 1 M asetaatti-HCl-puskuriin laimennettuna, jonka pH säädetään arvoon 4,5 väkevällä etikkahapolla. Leimauksessa reagenssit ovat reaktioastiassa 100 sekuntia 100°C:ssa. Reaktiotuote puhdistetaan C18-erotuspatruunalla ja patruunan eluoinnissa käytetään 50 % etanoli-vesi-liuosta (V/V).<sup>40</sup>

Radiokemiallisen puhtauden määrittämisessä käytetään TLC-menetelmää ja HPLC-menetelmää C-18-kolonnilla. TLC-menetelmä on välttämätön, koska HPLC-menetelmällä ei pystytä määrittämään <sup>68</sup>Ga-kolloidien määrää.<sup>38</sup> Kolloidit pidättyvät HPLC-menetelmässä kolonniin ja injektoriiin. <sup>68</sup>Ga-ionit puolestaan kulkevat kolonnin läpi ja näkyvät liuotinpiikissä.

### **2.2.3 Lutetium-177:n ominaisuudet**

Lutetium-177 on lyhyen kantaman beetasäteilijä, jota on alettu lähivuosina käyttää syöpähoidossa. Lutetium-177 hajoaa β<sup>-</sup>-hajoamisella stabiiliksi hafnium-177:ksi sekä suoraan että kolmen hafnium-177:n viritystilan kautta. Lutetium-177:n hajoamisessa muodostuu beetasäteilyn lisäksi myös havaittavaa gammasäteilyä. Beetasäteilyn maksimienergiat ovat 498,3 keV (79,3 %), 358,4 keV (9,1 %), 248,6 keV (0,012 %) ja 177,0

keV (11,64 %) ja gammaenergioista intensiivisimmät ovat 208,4 keV (10,38 %) ja 112,9 keV (6,20 %).<sup>34</sup> Hajoamiskaavio on esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Lutetium-177:n yksinkertaistettu hajoamiskaavio.

Matalaenergisien beetasäteilyn ansiosta lutetium-177 soveltuu hyvin kohdennettuihin syöpähoitoihin, koska säteilyn maksimikantama kudoksessa on  $\sim 2\text{ mm}$  ja siksi se absorboituu enimmäkseen kohdesoluihin. Osittainen gammasäteily puolestaan mahdollistaa  $^{177}\text{Lu}$ -isotoopin SPECT-kuvantamisen hoidon yhteydessä. Gammasäteily ei kuitenkaan lisää potilaan säteilyannosta merkittävästi, koska se on matalaenergistä ja melko vähäistä.  $^{177}\text{Lu}$ -leimatuista radiolääkkeistä tutkituimmat ja käytetyimmät ovat [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTA-peptidit: [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATOC, [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTANOC ja [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATATE. Taulukossa 3 on esitetty lutetium-177:n ominaisuudet rinnakkain muutaman terapeuttisen radionuklidien kanssa.<sup>26,41</sup>

**Taulukko 3.** Lutetium-177:n ja muiden terapeuttisessa käytössä olevien radionuklidien fysikaalisia ominaisuuksia. Uudelleenjulkaistu lähteestä Emmett, L.; Willowson, K.; Violet, J.; Shin, J.; Blanksby, A.; Lee, J. Lutetium 177 PSMA Radionuclide Therapy for Men with Prostate Cancer: A Review of the Current Literature and Discussion of Practical Aspects of Therapy. J. Med. Radiat. Sci. 2017, 64 (1), 52–60. Lisenssi: CC BY-NC-ND 4.0<sup>41</sup>

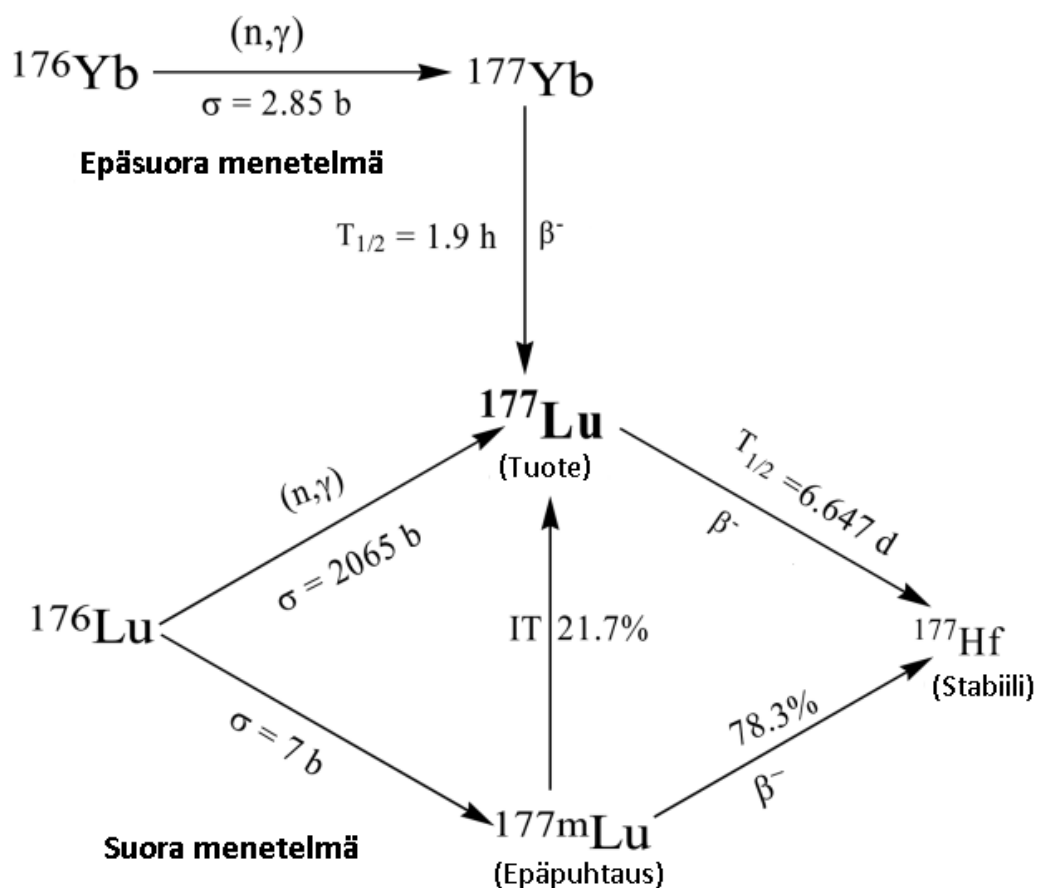
Radionuklidi	Fysikaalinen $T_{1/2}$ (d)	Säteilytyyppi (MeV)	Hiukkasen kantomatk (mm)
$^{131}\text{I}$	8	$\beta(0,6)$ , $\gamma(0,364)$	2
$^{90}\text{Y}$	2,67	$\beta(2,28)$	12
$^{67}\text{Cu}$	2,58	$\beta(0,54)$ , $\gamma(0,185)$	1,8
$^{186}\text{Re}$	3,77	$\beta(1,08)$ , $\gamma(0,131)$	5
$^{177}\text{Lu}$	6,7	$\beta(0,497)$ , $\gamma(0,208)$	1,5

Lutetium-177:lla on taulukon 3 beetasäteilijöistä alhaisin  $\beta$ -energia ja lyhin kantama, mikä tekee lutetium-177:sta erittäin suotuisan tarkasti kohdennettuun isotooppihoitoon. Muita etuja lutetium-177:ssa ovat  $\beta$ - ja  $\gamma$ -säteilyn suhde, potilaalle aiheutuva suhteellisen pieni säteilyannos ja ajankäytön joustavuus johtuen pitkähköstä puoliintumisajasta. Ajankäytön joustavuuden etuja ovat mm. lääkkeiden kuljetusmahdollisuudet ja mahdollisuus erilaisiin leimaus- ja laadunvalvontamenetelmiin. Lutetium-177:lla on myös ainoastaan hapetusluku +3. Hapetusluvun +3 ansiosta lutetium-177:lla voidaan leimata lukuisia erilaisia kantajamolekyylejä.<sup>26,42</sup>

#### 2.2.4 Lutetium-177:n ja [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:n valmistus

Lutetium-177 valmistetaan ydinreaktorilla käyttäen joko suoraa tai epäsuoraa menetelmää. *Suorassa menetelmässä* rikastettu <sup>176</sup>Lu-kohtio altistetaan neutronivuolle, jolloin reaktion <sup>176</sup>Lu (n,  $\gamma$ ) <sup>177</sup>Lu seurauksena muodostuu <sup>177</sup>Lu-isotooppia. Suora menetelmä vaatii rikastetun kohtion, sillä <sup>176</sup>Lu-isotoopin luontainen massaprosenttinen osuus lutetiumissa on vain 2,6 %. Suora menetelmä tuottaa kantajallista (CA) <sup>177</sup>Lu-lopputuotetta, jossa on mukana <sup>175</sup>Lu- ja <sup>176</sup>Lu- kantajaa. Lopputuotteen radionuklidista puhtautta huonontaa myös pitkäikäinen lutetium-177m ( $t_{1/2}$ =160,4d), jota muodostuu kilpailevassa reaktiossa <sup>176</sup>Lu (n,  $\gamma$ ) <sup>177m</sup>Lu.<sup>42–44</sup>

*Epäsuorassa menetelmässä* <sup>177</sup>Lu-isotooppia valmistetaan reaktiolla <sup>176</sup>Yb (n,  $\gamma$ ) <sup>177</sup>Yb  $\xrightarrow{\beta^-}$  <sup>177</sup>Lu, jossa rikastettu <sup>176</sup>Yb-kohtio altistetaan neutronivuolle ja muodostunut <sup>177</sup>Yb hajoaa  $\beta^-$ -hajoamisella lutetium-177:ksi. Lopputuotteesta käytetään nimitystä NCA (no carrier added) lutetium-177, koska se ei sisällä lisättyä kantajaa ja on likipitään kantajavapaata. <sup>177</sup>Lu-isotooppi erotetaan ytterbiumista kemiallisesti, koska radiolääkeainetuotannossa ytterbium kilpailee lutetiumin kanssa kompleksoitumisesta kelatoivan ryhmän kanssa. Epäsuoralla menetelmällä on täten mahdollista saada korkeamman spesifisen radioaktiivisuuden omaavaa <sup>177</sup>Lu-isotooppia.<sup>42,43</sup> Suora ja epäsuora menetelmä ovat esitetty kuvassa 9.<sup>45</sup>



Kuva 9. Lu-177:n valmistus suoralla ja epäsuoralla menetelmällä. Uudelleenjulkaistu luvalla (Elsevier, 2018) lähteestä Banerjee, S.; Pillai, M. R. A.; Knapp, F. F. R. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. Chem. Rev. 2015, 115 (8), 2934–2974. <sup>45</sup>

Yksi lutetium-177:n käyttökohteista on [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA, joka on eturauhassyövän hoitoon tarkoitettu moderni radiolääke. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA:lla voidaan tarkoittaa esimerkiksi [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617-radiolääkettä tai [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-I&T-radiolääkettä, joita käytetään radioliganditerapioissa (RLT). Radiolääkkeiden kliinisessä käytössä on saatu hyviä tuloksia molemmilla ligandeilla, joiden molekyyliarakenteet eroavat ainoastaan linkkimolekyylien osalta.<sup>46,47</sup> Tutkielman kokeellisessa osuudessa keskitytään kuitenkin ainoastaan [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617:n laadunvalvonnan kehittämiseen.

[ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617-radiolääkettä valmistetaan kliniseen käyttöön leimaamalla kaupallisesti valmistettua PSMA-617-lähtöainetta  $^{177}\text{Lu}$ -merkkiaineella. PSMA-617 on kaupallisesti saatavilla jauhemuodossa ja sen kanssa käytetään puskuriliuoksena

natriumaskorbaattiliuosta. Puskuriliuoksen tehtävä on sekä estää radiolyyysiä että optimoida reaktioseoksen pH leimausta varten, kun laimeassa suolahapossa oleva  $^{177}\text{Lu}$ -merkkiaine lisätään ( $^{177}\text{Lu}$ LuCl-muodossa) seokseen. Radiolyyysin estoon voidaan käyttää myös gentisiinihappoa ja etanolia. Leimauksessa  $^{177}\text{Lu}$ -merkkiaine ja lähtöaine sekoitetaan puskuriliuoksessa ja inkuboidaan 95 °C:ssa 15-30 min ajan. Reaktio voidaan tehdä manuaalisesti tai automatisoidussa synteesilaitteistossa. Synteesilaitteistolla voidaan pienentää työntekijöiden säteilyaltistusta ja pienentää kontaminaation riskiä. Metalliset epäpuhtaudet kilpailevat lutetium-177:n kanssa DOTA-ryhmään sitoutumisesta ja siksi lähtöaineiden ja reagenssien tulee olla erittäin puhtaita.<sup>48</sup>

## 2.3 [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu -PSMA eturauhassyövän hoidossa

Eturauhassyöpä on yleinen miesten pahanlaatuinen sairaus ja myös yleinen syy syövän aiheuttamissa kuolemissa.<sup>49</sup> Ennusteet etenemättömän eturauhassyövän hoidossa ovat hyvät, mutta aggressiivisempiin kasvaimiin liittyy korkea kuolleisuus.<sup>26</sup>

Eturauhassyövän hoidoissa käytetään hormonihoitoja, leikkaustoimenpiteitä, kemoterapiaa ja sisäistä sekä ulkoista sädehoitoa. PSMA-radioliganditerapioita on tehty lähinnä muiden hoitomuotojen epäonnistuttua, jolloin toiminta on perustunut Maailman lääkäriliiton Helsingin julistuksessa oleviin eettisiin periaatteisiin.<sup>50,51</sup> [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA tarjoaa etuja erityisesti pahanlaatuisen eturauhassyövän hoidossa, kun muista hoitomuodoista ei ole enää hyötyä.<sup>50</sup> [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 ja [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-I&T ovat olleet kliinisessä käytössä kastroatioresistentin metastasoineen eturauhassyövän (mCRPC) hoidossa<sup>9,52,53</sup>

[ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA annetaan hitaana suonensisäisenä injektiona tai infuusiona. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA laimennetaan fysiologisella suolaliuoksella ja kirjallisuudessa annosten aktiivisuudet ovat olleet välillä 3,4-9,7 GBq. Potilasta kohden on tehty hoidoissa 1-7 hoitosykliä.<sup>9,47,53-56</sup>

Potilaiden vastetta hoitoihin mitataan PSA-arvojen avulla. PSA (prostate specific antigen) on eturauhasen epiteelisoluista erittyvä entsyymi, jonka määrä kohoaa eturauhassyövän aikana.<sup>57</sup> [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-hoidoilla on saatu alennettua potilaiden PSA-arvoja tehokkaasti sekä saatu lievitettyä kipuja ja parannettua potilaiden elämänlaatua. Sivuvaikutuksia ovat

olleet muun muassa osittaisen hemotoksisuuden lisäksi suun kuivuminen ja väsymys.<sup>9,50,58</sup> Kulkarni *et al.*(2016) ja Rahbar *et al.*(2017) tekivät potilasmäärien suhteen laajimmat tutkimukset [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-hoidoilla. Kulkarni *et al.*<sup>47</sup> julkaisivat tulokset 190 potilaan hoidosta. Potilaat olivat saaneet 1-7 hoitosykliä 6 GBq keskimääräisellä annoksella ([<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 tai [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-I&T) ja 57,6 prosentilla potilaista PSA-arvo laski vähintään puoleen alkuperäisestä. Kaikkiaan PSA-arvo laski 76,3 prosentilla potilaista. Yleisimmät oireet potilailla olivat lievä väsymys ja suun kuivuminen. Rahbar *et al.*<sup>58</sup> julkaisivat PSA-tulokset 99 potilaasta tutkimuksessaan, jossa [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617-hoitosykliä (2-8 GBq) oli tehty 1-4 potilasta kohden. PSA-arvo laski 45 prosentilla potilaista vähintään puoleen alkuperäisestä ja kaikkiaan PSA-arvo laski 66 prosentilla potilaista. Asteen 3-4 hemotoksisuutta havaittiin sivuvaikutuksena 18 potilaalla. Potilailla oli kuitenkin taustalla laaja kirjo edeltäviä hoitoja, kuten androgeenideprivaatiohoitoa, abirateronihoitoa, entsalutamidihoitoa, kemoterapiaa, [<sup>223</sup>Ra]radium-dikloridihoitoa tai sädehoitoa. Virgolini *et al.* (2017) mukaan hemotoksisuuden riski on suurempi potilailla, jotka ovat ennestään saaneet mittavaa hoitoa kastroatioresistenttiin eturauhassyöpään.<sup>50</sup>

[<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-hoitojen jälkeen useiden potilaiden PSA-arvot ovat lopulta nousseet uudestaan eri ajanjakson jälkeen ja tämän takia [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-hoito ei näytä johtavan pitkäaikaiseen elpymiseen eturauhassyövästä<sup>9,55,56,59</sup>. Syövän hidastamisen, kipujen lievittämisen, vähäisen toksisuutensa ja mahdollisesti vaihtoehtojen puuttumisen vuoksi [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-hoidot ovat silti tärkeä hoitomuoto eturauhassyöpään, ja hoitojen kehittäminen etenee tutkimusten myötä.

### **3. Radiolääkkeiden laadunvalvonta**

Radiolääkkeiden valmistuksessa ja laadunvalvonnassa tulee noudattaa seuraavia ohjeita ja määräyksiä: Fimean määräykset, Suomen lääkelaite, GMP-ohjeet ja Euroopan farmakopea. Euroopan neuvoston julkaisemassa Euroopan farmakopeassa on esitetty eri lääkeaineille monografiat, joissa on kerrottu kemialliset, fysikaaliset ja biologiset menetelmät lääkeaineiden laadunvalvontaa varten.<sup>60</sup> Laadunvalvontaan kuuluvat fysikaalisten ominaisuuksien tarkastelu, pH:n, ionivahvuuden ja radioaktiivisuuden mittaaminen sekä

mikrobiologisen, kemiallisen, radionuklidisen ja radiokemiallisen puhtauden määrittäminen.<sup>61</sup>

Laadunvalvonnassa *fysikaalisten ominaisuuksien* tarkasteluun kuuluvat lääkkeen värin, olomuodon ja partikkelikoon tutkiminen. Värimuutokset, kolloidit tai muut poikkeamat voivat kertoa lääkkeen suuristakin muutoksista, jotka muuttavat lääkkeen biologista vaikutusta erilaisen imeytymisen ja metabolian kautta. Radiolääkkeen *pH* on lähes aina lähellä elimistön fysikaalista pH-arvoa. Euroopan farmakopean määrittämissä lääkekohtaisissa vaatimuksissa on kuitenkin useamman pH-arvoyksikön rajat. [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTATOC:n laadunvalvonnassa farmakopean asettamat rajat ovat pH 4-8.<sup>62</sup>

*Radiolääkkeen aktiivisuus* täytyy tietää silloin, kun lääkeaine annetaan potilaskäyttöä varten, ja samoin täytyy tietää potilaalle annettavien yksittäisten annoksien aktiivisuudet. Aktiivisuudet ilmoitetaan becquerel-yksiköissä ja ne mitataan annoskalibraattorilla. Aktiivisuusrajat ovat radiolääkeainekohtaisia, koska lääkkeet kertyvät elimiin eri tavoin. Monien radiolääkkeiden aktiivisuusrajat määräytyvät munuaisten säteilyannosrajojen mukaan, koska radioaktiivinen aine poistuu lopuksi munuaisten kautta. [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:n käytössä suurimmat säteilyannokset tulevat eturauhasen ohessa munuaisille sekä kyynel- ja sylkirauhasille.<sup>46</sup>

*Mikrobiologista puhtautta* tutkittaessa määritetään tuotteen steriiliys ja endotoksiinit. Steriiliydellä tarkoitetaan bakteerien määrää ja endotoksiinit ovat puolestaan bakteereista peräisin olevia myrkyllisiä aineita. Steriiliyden määrittämiseen on Euroopan farmakopeassa yleiset ohjeet kohdassa *Sterility* (2.6.1) ja endotoksiinien määrittämiseen yleiset ohjeet ovat kohdassa *Bacterial Endotoxins* (2.6.14).<sup>63</sup>

*Kemiallisella puhtaudella* tarkoitetaan halutun yhdisteen osuutta lääkeaineen kokonaisainemäärästä. Kemiallisia epäpuhtauksia ovat kaikki ei-toivotut yhdisteet ja alkuaineet, mitä lääkeaine sisältää, kuten lähtöaineiden epäpuhtaudet ja väärät synteesituotteet. Epäpuhtaudet voivat itsessään olla toksisia tai ne voivat leimautuessaan radioaktiivisella aineella myös haitata diagnostisia tutkimuksia. Kemiallisten epäpuhtauksien määrä minimoidaan kuitenkin jo ennen valmistusta käyttämällä GMP-laatuisia reagensseja



ja synteessivälineitä. Epäpuhtauksien määrittämisessä HPLC on moderni ja yleisesti käytetty menetelmä.<sup>64</sup>

*Radionuklidinen puhtaus* tarkoittaa halutun radionuklidin aktiivisuuden osuutta kokonaisaktiivisuudesta. Radionuklidista puhtautta määritettäessä ei huomioida, minkälaisia kemiallisia rakenteita haluttu radionuklidi muodostaa vaan määrittämisessä tarkastellaan ainoastaan radionuklideja. Radionuklidisia epäpuhtauksia esiintyy jo radiolääkeainetuotannon lähtöaineissa, mikäli lähtöaineen radionuklidi on hajonnut aktiivisiksi tytärynuklideiksi tai radionuklidin valmistuksessa on ollut epäpuhtauksia kohtiomateriaalissa. Epäpuhtauksia muodostuu myös sekundäärisinä aktivoitumistuotteina sekä myös, kun raskaat alkuaineet hajoavat. Radionuklidisen puhtauden määrittämiseen käytetään radioaktiivisen aineen karakteristista säteilyä sekä puoliintumisaikaa. Epäpuhtauksia voidaan tarvittaessa myös poistaa kemiallisten menetelmien avulla tai odottamalla tietyn radionuklidin puoliintumista. Epäpuhtauksien tunnistaminen on ehdottoman tärkeää potilasturvallisuuden kannalta. On hyvä myös muistaa se, että radionuklidinen puhtaus ei ole pysyvä tila, vaan se on riippuvainen nuklidien puoliintumisajoista.<sup>61</sup>

Lääkeaineen *radiokemiallisella puhtaudella* tarkoitetaan halutun radioleimatus yhdisteen aktiivisuuden osuutta lääkeaineen kokonaisaktiivisuudella. Puhtautta alentavat halutun radionuklidin muodostamat väärät kemialliset rakenteet, kuten vapaat radionuklidit, lääkeaineen väärät stereoisomeerit tai radiolyysin aiheuttamat hajoamistuotteet. Radiokemiallinen puhtaus on lääkeaineelle erittäin tärkeä ominaisuus, sillä radiokemialliset epäpuhtaudet voivat muun muassa huonontaa kuvantamisen tarkkuutta diagnostistiikassa tai lisätä tärkeiden elinten säteilyannoksia, varsinkin käytettäessä terapeuttisia aineita. Lääkeaineen radiokemiallinen puhtaus voi kuitenkin muuttua ajan myötä radiolyysin takia sekä lämpötilan tai valoisuuden muuttuessa. Tämän takia radiolääkeaineille annetaan säilyvyysaika, kuinka monta tuntia ja missä olosuhteissa lääke tulee säilyttää ennen injektiota.<sup>61</sup>

Euroopan farmakopeassa on esitetty lääkeainekohtaiset laatuvaatimukset radiokemiallisen puhtauden suhteen. Farmakopean monografioissa on määritetty radiokemiallisen

puhtauden osalta merkittävimmille epäpuhtauksille (kolloidit, vapaat radionuklidit, radionuklidiset epäpuhtaudet) prosentuaaliset ylärajat, joita ei saa ylittää. Radiokemiallisen puhtauden määrittämisessä hyvin yleisiä ovat kromatografiset menetelmät, joissa seoksen tai liuoksen komponentit erotetaan toisistaan ja niiden pitoisuudet määritetään. Tutkielman kokeellisen osuuden kannalta keskeisimmät kromatografiset menetelmät ovat ohutkerroskromatografia (TLC) ja korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC).

### 3.1 Ohutkerroskromatografia (TLC)

TLC-menetelmässä (thin-layer chromatography) on kaksi faasia: paikallaan oleva stationaarifaasi ja liikkuva faasi. Stationaarifaasi on adsorboivaa ainetta, joka on ohuena kerroksena lasi-, muovi- tai alumiinifoliolevyn päällä. Myös erilaisia päällystettyjä lasikuitupapereita on alettu kutsumaan TLC-materiaaleiksi erotuksena paperikromatografiasta. Tästä esimerkkinä ovat tutkielman kokeellisessa osuudessa käytetyt iTLC-SA ja iTLC-SG -levyt, joissa lasikuitupaperi on päällystetty silikahapolla (SA) ja silikageelillä (SG). Liikkuva faasi on tutkittavalle aineelle soveltuva liuotin, joka nousee TLC-levyä pitkin ylös.<sup>65</sup>

TLC-menetelmässä pisara tutkittavaa ainetta applikoidaan TLC-levylle ja levy asetetaan pystyasentoon kammioon, jossa liikkuvana faasina toimivaa liuotinta on pohjalla. Liuottimen annetaan nousta kapillaarivoimien avulla TLC-levyä pitkin ylös halutulle korkeudelle. Tällöin tutkittavan yhdisteen eri ainesosat nousevat liuottimen mukana eri nopeuksilla, riippuen niiden kemiallisista rakenteista, ja erottuvat toisistaan. TLC-levy mitataan tutkittaville aineille soveltuvalla menetelmällä, kuten fluoresenssin avulla, UV-valolla, säteilyn mittaamisella tai kemiallisesti kehitysaineella. Radiolääkkeitä tutkittaessa TLC-levyjen analyysi tehdään joko autoradiografialla, TLC-skannerilla tai leikkaamalla levy osiksi ja mittaamalla osat erikseen kammiolaskurissa. Tuloksena saadaan tutkittavan yhdisteen radioaktiivisuusjakauma, josta nähdään halutun yhdisteen ja epäpuhtauksien pitoisuudet.<sup>61</sup> Tutkielman kokeellisessa osuudessa pitoisuudet lasketaan piikkien pulssimääristä ( $n$ ) ja niiden virheenä käytettiin standardipoikkeamaa  $\pm\sqrt{n}$ .<sup>66</sup> Tällöin

mittauksessa tarvitaan yli 10 000 pulssia, jotta pulssimäärän suhteelliseksi virheeksi tulee <1 %.

TLC on menetelmänä erittäin herkkä, helppokäyttöinen, edullinen ja siinä käytetään vain muutaman mikrolitran näytetilavuuksia. Tämän takia henkilöstön säteilyannokset ja radioaktiivisen jätteen määrä ovat myös pieniä. TLC:llä pystyy tekemään sekä kvalitatiivisia että kvantitatiivisia mittauksia. TLC-menetelmän luotettavuutta mitataan erilaisten kansainvälisten standardien avulla. Herkkyysrajalla (limit of detection, LOD, tai toteamisraja) tarkoitetaan malliaineen määritettävissä olevaa pitoisuustasoa. Herkkyysraja määritellään yleensä signaali-kohinasuhteella (signal to noise ratio, S/N) 3:1, mutta suhdelukua 2:1 käytetään myös. Kun määritetään oikean näytteen pitoisuutta, jossa on mukana näytematriisi, käytetään määritysrajana (limit of quantification, LOQ) tavallisesti signaali-kohinasuhdetta 10:1.<sup>67</sup>

Menetelmän optimoimisen kannalta on tärkeää löytää sopiva stationaarifaasi ja liikkuva faasi, mutta myös luotettava ja sopivan kokoinen TLC-laitteisto. Taulukoissa 4 ja 5 on esitetty eri tarkoituksiin sopivia stationaarifaaseja ja liikkuvia faaseja.<sup>61,65</sup>

**Taulukko 4. TLC-menetelmässä käytettyjä stationaarifaaseja. Kuva perustuu kirjan Chromatographic Methods (Braithwaite, 2012) taulukkoon 3.1.**<sup>65</sup>

Stationaarifaasi	Käyttökohde
Silikageeli	Aminohapot, alkaloidit, sokerit, rasvahapot, lipidit, epäorgaaniset anionit ja kationit, steroidit, terpenoidit
Alumina	Alkaloidit, ruokien väriaineet, fenolit, steroidit, vitamiinit, karoteenit, aminohapot
Piimaa	Sokerit, oligosakkaridit, rasvahapot, aminohapot, steroidit
Celite	Steroidit, epäorgaaniset kationit,
Selluloosapulveri	Aminohapot, ruokien väriaineet, alkaloidit
Ioninvaihtoselluloosa	Nukleotidit, halidi-ionit
Tärkkelys	Aminohapot
Polyamidipulveri	Aromaattiset hapot, antioksidantit, flavonoidit, proteiinit, antosyaanit
Sephadex	Nukleotidit, proteiinit, metallikompleksit

Taulukko 5. TLC-menetelmässä käytettyjä liuottimia. Kuva perustuu kirjan Chromatographic Methods (Braithwaite, 2012) taulukkoon 3.2. <sup>65</sup>

Liuotin	Suhteellinen permittiivisyys (25 °C)
Heksaani	1,89
Sykloheksaani	2,02
1,4-Dioksaani	2,21
Hiilitetrakloridi	2,24
Bentseeni	2,28
Tolueeni	2,38
Asetonitriili	3,88
Dietyylieetteri	4,34
Kloroformi	4,87
Muurahaishappo	5,0
2-Metyylibutan-2-oli	5,82
Etyyliasetatti	6,02
Etikkahappo	6,15
Tetrahydrofuraani	7,58
Dikloorimetaani	9,14
2-Metyylipropaan-2-oli	10,9
Pyridiini	12,3
Butan-2-oli	15,8
2-Metyylipropaan-1-oli	17,7
Butan-1-oli	17,8
Propan-2-oli	18,3
Propan-1-oli	20,1
Asetoni	20,7
Etanoli	24,3
Metanoli	33,6
Vesi	78,3

Silikageeli on käytetyin stationaarifaasien adsorbenteista. Silikageelin synteesissä päästään erittäin puhdaaseen lopputuotteeseen ja materiaalin huokosten kokoa pystytään kontrolloimaan tarkasti. TLC-menetelmässä resoluutio ja erotustehokkuus riippuvat hyvin paljon stationaarifaasin partikkelikoosta ja homogeenisyydestä. Adsorboivilla aineilla on lisäksi ominaiset kykynsä aineiden pidättämiseen. Silikageelissä aktiiviset ryhmät ovat OH- ja silanoliryhmät, jotka vuorovaikuttavat tutkittavan aineen kanssa. <sup>65</sup>

TLC-menetelmässä tulokset ilmaistaan  $R_f$ -arvojen avulla, joiden määritelmä on:

$$R_f = \frac{\text{liuenneen aineen kulkema etäisyys}}{\text{liuosrintaman kulkema etäisyys}} (1) \quad ^{65}$$

$R_f$ -arvojen kanssa on tärkeä huomioida, että ne eivät ole aineelle ominaisia absoluuttisia fysikaalisia arvoja vaan ne riippuvat monesta tekijästä, kuten liuottimesta, lämpötilasta,

TLC-kammion koosta ja stationaarifaasin koostumuksesta. Käyttäen apuna standardinäytteitä, voidaan  $R_f$ -arvot ilmoittaa myös suhteellisina  $R_{st}$ -arvoina, jotka ovat lähempänä vakioarvoja eri olosuhteissa.

### 3.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC)

HPLC -menetelmällä tarkoitetaan korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (High Performance Liquid Chromatography). Menetelmässä käytetään nestekromatografiaa, joka erottelee nestefaasissa olevat yhdisteet kolonnin avulla. Kolonnissa aineet pidättyvät eri tavoin sen mukaan, kuinka suuri affiniteetti niillä on kolonnissa olevaan stationaarifaasimateriaaliin ja eluoituvat ulos sen mukaan, kuinka suuri affiniteetti niillä on ajoliuokseen eli liikkuvaan faasiin. Tutkielman kokeellisessa osuudessa käytetyt kolonnit olivat kummatkin C-18 kolonneja. Kolonnit perustuivat käänteisfaasikromatografiaan, jossa hydrofobiset yhdisteet kiinnittyvät hydrofobisiin rakenteisiin kolonnissa. Kolonnit erosivat toisistaan partikkelikoon ja -rakenteen suhteen: Gemini-kolonnissa oli huokoiset 3  $\mu\text{m}$  partikkelit, kun taas Kinetex-kolonnissa oli kiinteän ytimen 2,6  $\mu\text{m}$  partikkelit. Gemini-kolonnissa analyytit kulkevat partikkeleiden läpi, kun taas Kinetex-kolonnissa analyytit vuorovaikuttavat vain partikkelien pinnan kanssa. Tämän takia Kinetex-kolonnissa vyöhykeleveneminen on pienempi ja erotustehokkuus on parempi.<sup>68</sup> Analyyttien pidättymistä kolonniin ja eluoitumista säädellään liikkuvan faasin ajoliuossuhteella. Tutkimuksessa käytetty liikkuva faasi oli kahden yhdisteen seos: hydrofiilisen- ja hydrofobisen yhdisteen. Hydrofiilinen osuus oli 0,1 % TFA-Vesi -liuosta ja hydrofobinen osuus oli 0,1 % TFA-asetonitriili -liuosta. Kolonnin ja ajoliuoksen lisäksi yhdisteiden erottumiseen voidaan vaikuttaa ajoliuoksen virtausnopeuden ja kolonnin lämpötilan säätelyllä. Yhdisteet liikkuvat detektorin ohi, joka havaitsee yhdisteet. Tutkimuksen kokeellisessa osuudessa käytettiin HPLC-laitetta, jossa oli UV-detektori mittaamassa aallonpituuden 220 nm absorbanssia sekä NaI-radioaktiivisuudetektori.

Tutkittavan aineen retentioaika, erotustehokkuus ja piikin muoto ovat keskeisiä HPLC-menetelmän analytiikassa. Retentioajalla tarkoitetaan aikaa, joka analyytiltä kuluu kulkiessaan injektorilta detektorille. Erotustehokkuutta ilmaistaan erilaisilla termeillä,

kuten resoluutiolla, retentiotekijällä ja erotustekijällä. Tutkimuksen kokeellisessa osuudessa käytettiin erotustekijää, jonka kaava on:

$$\alpha = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} (2)^{67}$$

missä  $t_{R1}'$  on aiemman piikin retentioaika ja  $t_{R2}'$  on jälkimmäisen piikin retentioaika. Menetelmän resoluutio paranee erotustekijän kasvaessa. Piikin muodosta voidaan havaita monia asioita. Optimitapauksessa piikki on symmetrinen Gaussin jakauman mukaisesti ja kapea. Liian suuren näytekapasiteetin, näytekonsentraation, injektointilavuuden tai muun syyn takia piikki voi kuitenkin häntiä tai olla tasahuippuinen. Häntimistä aiheuttaa muun muassa se, että näyte leviää kolonnissa liian suurelle alueelle liian suuren näytetilavuuden takia tai kolonnin retentiopaikat eivät riitä pidättämään näytemolekyylejä niiden suuren konsentraation takia. Häntimistekijän arvolle yleisesti hyväksyttävät rajat ovat 0,9-1,5.<sup>69</sup> Tasahuippuisuus puolestaan johtuu detektorin ylikuormittumisesta.<sup>67</sup>

HPLC-menetelmällä voidaan tutkia myös polymeerisia, polaarisia, ionisia ja muita termisesti epävakaita aineita. Menetelmän muita etuja ovat muun muassa kolonnien pitkäikäisyys, automatisoitu näytteenotto ja mahdollisuus detektoida ja kvantitoida jatkuvasta virtauksesta.<sup>65</sup>

### 3.3 [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:n laadunvalvontamenetelmä

[<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:n valmistuksessa potilaskäyttöön tehdään laadunvalvonta GMP-vaatimusten mukaan. [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-tuotteiden laadunvalvontaan ei ole kuitenkaan vielä olemassa farmakopean menetelmää. Tuotantoerän laadunvalvonnassa tuotteesta tarkastetaan fysikaaliset ominaisuudet (väri, kirkkaus), pH, radioaktiivisuus sekä määritetään radionuklidinen, radiokemiallinen, kemiallinen ja mikrobiologinen puhtaus. Tuote tarkastellaan visuaalisesti, että se on partikkeliton ja kirkas. Tuotteen aktiivisuus mitataan esimerkiksi annoskalibraattorilla synteessin päätteeksi sekä määritetään tuotteen puoliintumisaika. Puoliintumisajan tulee olla lähellä lutetium-177:n puoliintumisaikaa (6,7 d), mikäli tuotteessa ei ole radioaktiivisia epäpuhtauksia. Puoliintumisaikaa ei ole tarpeen laskea, mikäli käytetään myyntiluvallista <sup>177</sup>Lu-merkkiainetta, koska silloin radionuklidisesta puhtaudesta on vastuussa merkkiaineen valmistaja. Kemiallisen puhtauden osalta

tuotteesta voidaan määrittää esimerkiksi synteesireaktion lähtöaineiden, kuten PSMA-617:n pitoisuuden tai muun mahdollisen epäpuhtauden, kuten etanolin pitoisuus. Mikrobiologista puhtautta tutkittaessa määritetään tuotteen steriiliys ja endotoksiinit.<sup>63</sup>

[<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:n radiokemiallisen puhtauden määrittämiseen on kirjallisuudessa käytetty TLC-, HPLC- ja PC-menetelmiä (paperikromatografia).<sup>48,54–56,70</sup> TLC-menetelmissä on käytetty ajoliuoksina 0,1 M tri-natriumsitraattiliuosta sekä 1 M ammoniumasetaatti:metanoli 1:1 (v/v) -ajoliuosta. Sitraattiliuoksen kanssa on käytetty Merckin SilicaGel 60 -levyjä ja Varianin iTLC-SG-levyjä ja ammoniumasetaatti-liuoksen kanssa on käytetty iTLC-SG-levyjä. Menetelmät eroavat toisistaan siten, että sitraattiliuoksen kanssa vapaa lutetium-177 kulkee liuosrintaman mukana ja [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA jää applikointipisteeseen, kun taas ammoniumasetaattiliuoksen kanssa [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA kulkee liuosrintaman mukana ja vapaa <sup>177</sup>Lu jää applikointipisteeseen.<sup>48,70</sup> PC-menetelmässä on käytetty asetonitrili:vesi 1:1 (v/v) -liuosta ja Whatmanin 3 mm kromatografiapaperia, jolloin [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA kulkeutuu liuosrintaman mukana ja vapaa lutea jää applikointipisteeseen.<sup>70</sup>

TLC on menetelmänä yksinkertainen ja sen kanssa radiokemiallisen puhtauden tulisi olla 98 %.<sup>44</sup> HPLC on puolestaan herkempi menetelmä, jolla epäpuhtauksien havaitseminen on helpompaa ja siksi 98 % puhtauteen on myös vaikeampi päästä. HPLC-menetelmällä ei myöskään nähdä tuotteen kolloideja ja siksi tarvitaan myös TLC-menetelmää.<sup>71</sup> [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:n laadunvalvontaan suunnatuissa HPLC-menetelmissä on käytetty sekä isokraattista ajoliuoskoostumusta että gradienttiajoja. HPLC-menetelmissä on käytetty asetonitrili-vesi-ajoliuosta, jossa on 0,1 % trifluorietikkahappoa.<sup>48</sup> Saadut radiokemialliset puhtaudet ovat kirjallisuudessa välillä >92-100%<sup>48,54,70</sup> ja spesifiset radioaktiivisuudet ovat <sup>177</sup>Lu-radiolääkkeissä tyypillisesti välillä 37-74 MBq/μg.<sup>72</sup>

### 3.4 Metallikontaminaatiot

Radiolääkkeiden valmistuksessa lopputuotteilta vaaditaan erittäin korkeaa puhtautta läpäistäkseen laadunvalvonnan kriteerit. Radiolääkkeissä käytetyt radionuklidipitoisuudet ovat lisäksi verrattain pieniä, jolloin pienetkin määrät epäpuhtauksia voivat alentaa lääkeainesynteesien saantoa.<sup>11</sup>

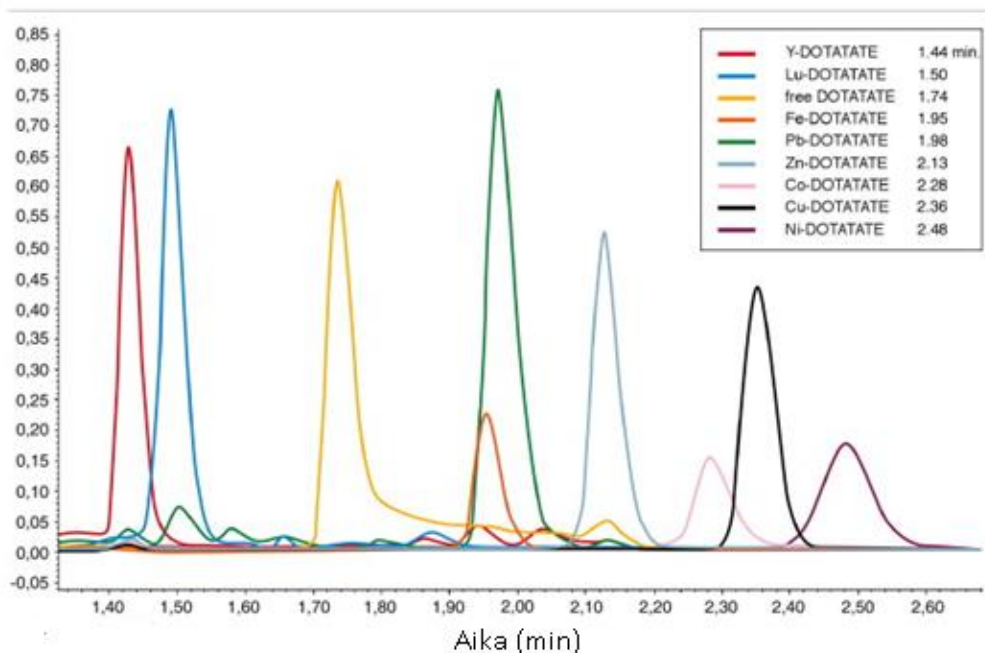
$^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeissä eniten käytetty radionuklidin sitomiseen on kelatoiva ryhmä DOTA. DOTA-ryhmä ei ole kuitenkaan selektiivinen  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ - ja  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -ioneille vaan se pystyy muodostamaan komplekseja useamman kationin kanssa. DOTA-ryhmällä on erityisesti korkea affiniteetti kompleksoitua monen siirtymämetallikationin, kuten  $\text{Fe(III):n}$ ,  $\text{Ni(II):n}$ ,  $\text{Co(II):n}$ ,  $\text{Cu(II):n}$  ja  $\text{Zn(II):n}$  kanssa.<sup>73</sup> Tämän takia radiolääkkeiden synteeseissä pyritään minimoimaan kontaminaatoriskit käyttämällä metallivapaita reagensseja ja tarvikkeita, sekä kasettipohjaisia synteasilaitteistoja.

Radioleimaukseen tarkoitettuihin  $^{177}\text{Lu}$ -valmisteisiin (*Lutetium*[ $^{177}\text{Lu}$ ]liuos radioaktiiviseen leimaukseen) tulee epäpuhtauksia ydinreaktorissa käytetystä kohtiomateriaalista. Lutetium-68-valmisteen epäpuhtauksille, kuten raudalle, kuparille, sinkille ja lyijylle, on annettu maksimipitoisuudet Euroopan farmakopean monografiassa: 0,5  $\mu\text{g/GBq}$  raudalle ja lyijylle, ja 1  $\mu\text{g/GBq}$  kuparille ja sinkille.<sup>74</sup>

$^{68}\text{Ga}$ -radiolääkeaineiden tuotannossa metallisia epäpuhtauksia tulee reagenssien ja muun laitteiston lisäksi  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generaattoreista. Generaattoreista peräisin olevia metallikationeja ovat muun muassa  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ja  $\text{Zn}^{2+}$ , joista  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ja  $\text{Zn}^{2+}$  ovat  $\text{Pb}^{2+}$ :n kanssa osoittautuneet haitallisimmiksi tutkittaessa [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTATATE:n kompleksoitumista. Hapetustilassa +IV olevat metallit eivät kilpaile gallium-68:n kanssa kompleksoitumisessa.<sup>11</sup> Sen sijaan  $\text{Fe}^{3+}$  on fysikaalisilta ominaisuuksiltaan hyvin samankaltainen  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ :n kanssa ja siksi se kilpailee vahvasti kompleksoitumisessa. Raudalla vallitsee hapetustila +III kuitenkin vasta neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa. Happamissa olosuhteissa leimatessa raudan vallitseva olomuoto  $\text{Fe(II)}$  on huomattavasti vähemmän kilpaileva kationi  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ :n kanssa.<sup>11</sup>  $\text{Cu}^{2+}$ :n on puolestaan huomattu aiheuttavan transmetallaatiota [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTATATE:n kanssa, jolloin  $\text{Cu}^{2+}$ -kontaminaatio saattaa syrjäyttää gallium-68:n onnistuneen leimauksenkin jälkeen.<sup>75</sup>

DOTA-ryhmän kompleksoituminen eri metallien kanssa on havaittavissa HPLC-menetelmällä yhdisteen retentioajan muuttumisena. Kuvassa 10 on esitetty eri metallien vaikutus DOTATATE:n retentioaikaan HPLC-menetelmässä.<sup>73</sup> Kuvasta on merkittävää myös huomata, että yhdisteen retentioaika kasvaa, mikäli DOTATATE leimautuu raudalla, lyijyllä, sinkillä tai kuparilla lutetiumin sijaan.





**Kuva 10.** Eri metallien vaikutus DOTATATE:n retentioaikaan HPLC-menetelmässä. HPLC-menetelmän olosuhteet: 27% ACN, 73% 0.1% vol/vol TFA-vesi, liuosnopeus 0.35 ml/min. Uudelleenjulkaistu luvalla (Elsevier, 2018) lähteestä Asti, M.; Tegoni, M.; Farioli, D.; Iori, M.; Guidotti, C.; Cutler, C. S.; Mayer, P.; Versari, A.; Salvo, D. Influence of Cations on the Complexation Yield of DOTATATE with Yttrium and Lutetium: A Perspective Study for Enhancing the  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  Labeling Conditions. Nucl. Med. Biol. 2012, 39 (4), 509–517. <sup>73</sup>

## **4. Kokeellisen työn tarkoitus**

Tutkielman kokeellisessa osuudessa pyrittiin löytämään HPLC - ja TLC - menetelmiin parhaat erotusolosuhteet ja mittausparametrit  $^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontaa varten. Sairaalakäytössä laadunvalvonnalle on tärkeää, että menetelmät ovat GMP:n mukaisia, nopeita, luotettavia ja mahdollisimman yhdenmukaisia. Yhdenmukaisuus eri radiolääkkeiden laadunvalvonnan välillä helpottaa muun muassa käytännön työskentelyä ja jätteenkäsittelyä sekä pienentää inhimillisen virheen riskiä. Työssä kehitettiin HPLC-menetelmä  $^{177}\text{Lu}$ Lu-PSMA -radiolääkkeelle, jonka tuotantoa suunnitellaan aloitettavan HUS-laboratoriossa. HPLC-kokeissa tutkittiin kahden C-18 kolonnin (Gemini ja Kinetex) ja erilaisten mittausgradienttien soveltuvuutta  $^{177}\text{Lu}$ Lu-PSMA:n laadunvalvontaan. Sopivan HPLC-menetelmän löydyttyä valmistettiin standardisarja inaktiivisesta PSMA-617-lähtöaineesta ja sen avulla tehtiin

massakvantitointi PSMA-617 -peptidille. HPLC-kokeissa tutkittiin myös, kuinka Fe(III)-kontaminaatiot vaikuttavat  $^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvonnassa.

TLC-kokeiden painopiste oli siinä, miten  $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeiden kanssa käytettyä laitteistoa voitaisiin käyttää myös  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvonnassa ja miten TLC-menetelmistä saataisiin mahdollisimman nopeita ja luotettavia. Kokeissa tutkittiin ajoliuosten, TLC-skannerin mittaussopeuden ja -jännitteen vaikutusta, sekä ROTOP QC-ITLC-laadunvalvontasetin soveltuvuutta  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontaan. Työn tavoitteet ovat alla tiivistettyinä ja numeroituina:

1. HPLC-menetelmän kehitys [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617-radiolääkkeelle
2. PSMA-617-peptidille massakvantitointi kehitetyllä HPLC-menetelmällä
3. Lutetium-177:n gammaspektrin määrittäminen Hidex-gammalaskurilla
4. TLC-menetelmien yhtenäistäminen ja mittausparametrien optimointi  $^{177}\text{Lu}$  - ja  $^{68}\text{Ga}$  -radiolääkkeiden laadunvalvonnassa
5. ROTOP QC-ITLC-laadunvalvontasetin soveltuminen radiolääkkeiden laadunvalvontaan
6. Fe(III)-kontaminaatioiden vaikutus  $^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden retentioaikoihin HPLC-menetelmässä

## **5. Reagenssit ja laitteisto**

Tutkimuksessa käytettiin HUS-laboratorion valmistamia [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOC-, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-HBED-, [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATOC- ja [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATATE-radiolääkkeitä sekä MAP Medical Technologies OY:n valmistamaa [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-radiolääkettä. Työssä käytetyt näytteet saatiin potilaskäyttöön hyväksytyistä radiolääkkeistä. Taulukossa 6 on esitetty tutkimuksen kokeellisessa osuudessa käytetyt muut reagenssit ja taulukossa 7 on esitetty tutkimuksen kokeellisessa osuudessa käytetyt laitteet.

**Taulukko 6. Tutkimuksessa käytetyt reagenssit.**

Reagenssit	
PSMA-617 -referenssi	Prod.No. 9934.0000.100 PSMA-617 (GMP), 100µg, ABX advanced biochemical compounds GmbH
DOTA-TOC -referenssi	Prod.No. 9702.0000.115 DOTA-TOC acetate(GMP), 115µg, ABX advanced biochemical compounds GmbH
DOTA-NOC -referenssi	J5/2017, DOTA-NOC, 1mg/ml (TraceSelect) , ABX advanced biochemical compounds GmbH
PSMA-11 -referenssi	Prod.No. 9921.0000.020 PSMA-11 (GMP), 20µg, ABX advanced biochemical compounds GmbH
Ammoniumasetaatti	Ammonium acetate, Ph Eur., 1.0116.0500, EMSURE®, Merck
HCl	Vetykloridihappoliuos, 0,1 M, 60 ml, Ultrapure, Merck
Vesi, steriili	Aqua TraceSELECT® Fluka, HUS Apteekki, OV2015/00570, steriililiuos, Sigma-Aldrich
Vesi, ultrapuhdas	Milli-Q®, Millipore corporation
Asetaatti-HCl puskuri	Natr.acet.trihydr.(Sigma) 136mg, Aq.(water for traceSELECT, Fluka) 1ml, Acid. hydrochlor. 30%(Merck) 0,02ml, Acid. acet. glacial (sigma) q s, (pH 4,5), 5ml, HUS-APTEEKKI
MeOH	Methanol, HPLC Grade, RH1019, Rathburn
Fe(III)Cl	Iron(III) chloride, 701122, 1mg, sublimed grade, >99,9 % trace metals, Sigma-Aldrich
Askorbiinihappo	L(+)-Ascorbic Acid, 83568.180, Ph Eur./USP, VWR CHEMICALS
Natriumaskorbaatti	Natriumascorbat, 4429-50J, Ph.Eur. 8.0, Caelo

**Taulukko 7. Tutkimuksessa käytetyt laitteet.**

Laite	Malli ja valmistaja
HPLC-ohjelmisto	LC-solution, Shimadzu
HPLC-pumppu	LC-20AT, Shimadzu
HPLC-degassing unit	DGU-20A5R, Shimadzu
HPLC-ohjausyksikkö	CBM-20A, Shimadzu
UV/VIS-detektori	SPD-20A, Shimadzu
HPLC-kolonniuuni	CTO-10ASVP, Shimadzu
Automaattinen näytteenottaja	SIL-20A HT, Shimadzu
HPLC-radioaktiivisuusdetektori	1" NaI/PMT, LabLogic
HPLC-kolonnit	00F-4439-Y0, Gemini® C18 (3 µm), 150x3 mm, huokoiset partikkelit, Phenomenex ,  00F-4725-Y0, Kinetex® EVO C18 (2,6 µm), 150x3 mm, kiinteän ytimen partikkelit, Phenomenex
TLC-skanneri	SR-1B, LabLogic
TLC-detektori	PS Plastic/PMT, LabLogic
TLC-levyt	A120B12, Chromatography paper, impregnated with silica acid (TLC-SA), Varian SGI0001, Chromatography paper, impregnated with silica gel (iTLC-SG), Agilent Technologies
Autoradiografia-laitteisto	Cyclone Plus Storage Phosphor System, PerkinElmer
Gamma-laskuri	Automatic gamma counter, Hidex
TLC-minikitti	ROTOP QC-ITLC Basis, ROTOP Pharmaka AG

## 6. Menetelmät

### 6.1 $^{177}\text{Lu}$ ja $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontamenetelmät

#### 6.1.1 HPLC-menetelmä $^{177}\text{Lu}$ - PSMA-617:lle

Sopivan HPLC-menetelmän kehittäminen aloitettiin tutkimalla erilaisia gradienttimenetelmiä Gemini-kolonnilla. Gradienttimittauksissa pyrittiin löytämään sopiva menetelmä [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA:lle käyttäen samoja ajoliuoksia, kuin [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATOCin, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA:n ja [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOC:n laadunvalvonnassa käytetään. Käytetyt ajoliuokset olivat: 0,1 % TFA-vesi (A-liuos) ja 0,1 % TFA-asetonitrili (B-liuos). Tutkimuksessa käytettiin aktiivisen [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617-valmisteen laadunvalvontanäytteestä (QC-näyte) otettua osanäytettä sekä PSMA-617 peptidistä laimennettua inaktiivista näytettä. Taulukossa 8 on esitetty näytteiden valmistus.

Taulukko 8.  $^{177}\text{Lu}$ ]Lu -PSMA - ja PSMA-617 -näytteet HPLC-kokeissa.

Näyte	Laimennus	Aktiivisuus
[ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617-valmiste, MAP Medical	-	6630 MBq/3,52 ml
Potilasannos ja QC-näyte	3,52:100, (valmiste:0,9 % NaCl)	64,05 MBq/ml
[ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617-näyte	1:4 (QC:TraceSELECT)	12,81 MBq/ml
PSMA-617 -lähtöaine	100 µg/ 200 µL (ref./TraceSELECT)	-

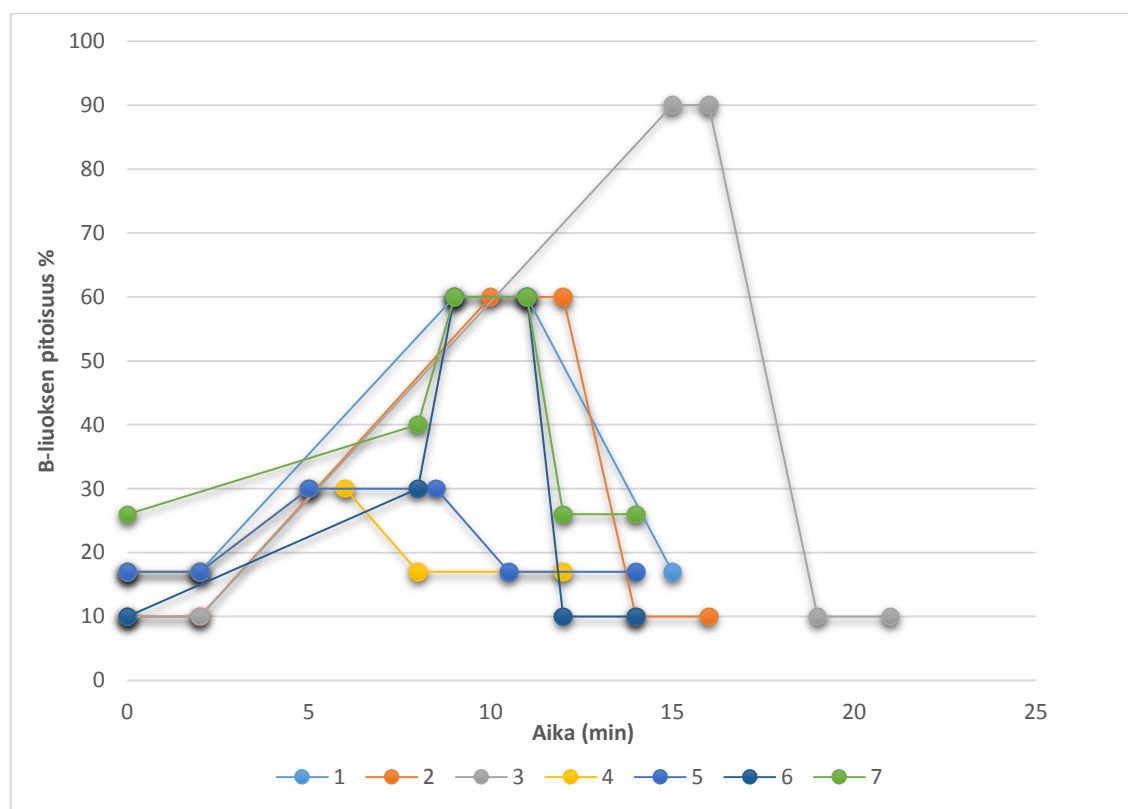
HPLC-näytepulloissa käytettiin pienille näytetilavuuksille tarkoitettuja 100 µL microinsert-sisäputkia. Taustanäytteinä käytettiin traceSELECT-vettä sisältäviä HPLC-näytepulloja.

[ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA:lle kokeiltiin [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATOC –omavalmisteen laadunvalvonnassa käytettyä gradienttiä, jossa B-liuoksen (0,1 % TFA-asetonitrili) pitoisuus nostettiin 17 %:sta 30 %:iin ja takaisin 14 minuutin mittauksessa (kuva 11, gradientti 4). Lisäksi kokeiltiin pitkää gradienttiä mukaillen Das T. *et al.* (2016)<sup>76</sup> käyttämää menetelmää, jossa B-liuoksen pitoisuus oli muutettu 10 prosentista 95 prosenttiin 30 minuutin mittauksessa. Pitkää menetelmää muokattiin kuitenkin nousemaan vain 90 prosenttiin kolonnin säästämisen ja mittausajan lyhentämisen vuoksi (Kuva 11, gradientti 3). Ajankäytön optimoimiseksi

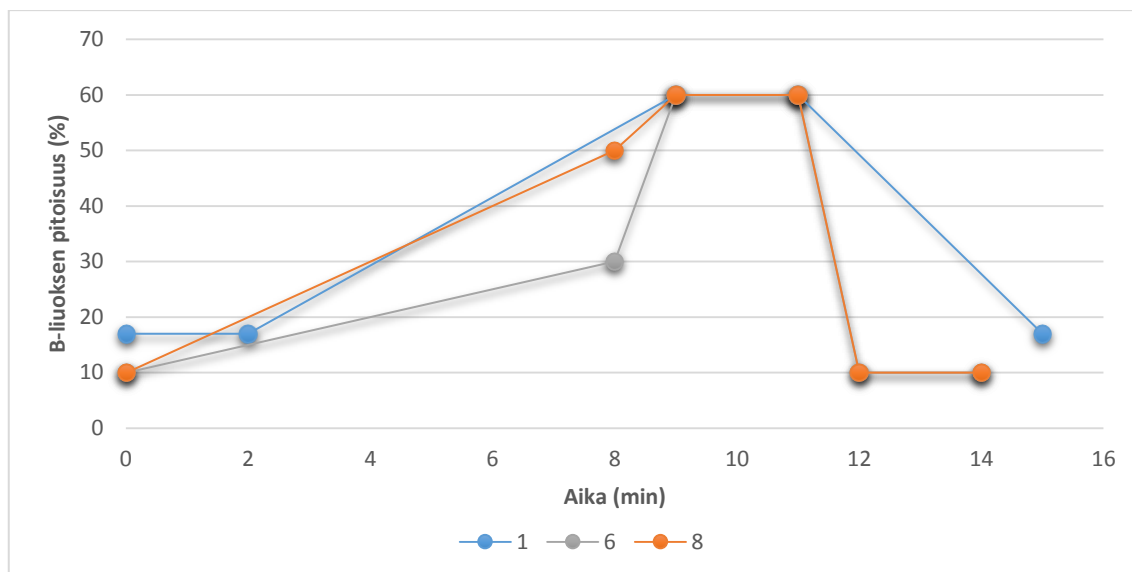
sairaalakäyttöä varten, menetelmää muokattiin edelleen lyhyemmäksi ja B-liuoksen alkupitoisuutta korkeammaksi.

HPLC-menetelmän toimivuutta arvioitiin retentioajan lisäksi piikin muodon mukaan. Piikin tuli olla terävä ja symmetrinen mahdollisimman lähelle Gaussin jakauman mukaisesti. Piikin häntimistä eli piikin jälkimmäisen puoliskon levenemistä havainnoitiin häntimistekijän avulla.

Näytteiden kanssa Gemini-kolonnilla testatut gradienttiairot ovat esitetty kuvassa 11 ja Kinetex -kolonnilla testatut gradientit ovat esitetty kuvassa 12.



**Kuva 11.** Gemini-kolonnilla testatut HPLC-gradienttimittaukset [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA -näytteelle ja inaktiiviselle PSMA-617 -näytteelle. Kuvaajassa on esitetty B-liuoksen pitoisuus ajan funktiona. Kokeissa on käytetty kahta liuosta: 0,1 % TFA-vesi (A-liuos) ja 0,1 % TFA-asetonitrili (B-liuos). Ajoliuoksen virtausnopeus on ollut 0,6 mL/min ja kolonniuunin lämpötila 40°C.



**Kuva 12.** Kinetex-kolonnilla testatut HPLC-gradienttimittaukset. Kuvaajassa on esitetty B-liuoksen pitoisuus ajan funktiona. Kokeissa on käytetty kahta liuosta: 0,1 % TFA-vesi (A-liuos) ja 0,1 % TFA-asetonitrili (B-liuos). Ajoliuoksen virtausnopeus oli 0,45 mL/min ja kolonniuunin lämpötila oli 40°C. [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA -näytteellä ja inaktiiviselle PSMA-617 -näytteellä ajettiin gradientti 1. Gradientit 6 ja 8 ajettiin PSMA-11- ja DOTANOC -näytteillä.

### 6.1.2 PSMA-617:n massakvantitointi HPLC-menetelmällä

Massakvantitoinnissa laadittiin kalibrointisuora PSMA-617-peptidin ainemäärästä HPLC-menetelmän piikin pinta-alan funktiona. Kalibrointisuoran avulla määritetään [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:n ainemäärä massapiikin avulla, kun [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-näyte ajetaan vastaavissa olosuhteissa.

PSMA-617-peptidin massakvantitoinnissa PSMA-617-lähtöaine laimennettiin traceSELECT-veteen. Pitoisuudet olivat 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL ja 0,1 µg/mL. Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin 3-5 toistoa. Laimennussarjan keskellä olevista pitoisuuksista 10 µg/mL vastasi [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-tuotteen pitoisuutta (MAP Medical, [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA, ≤12 µg/mL)<sup>77</sup> ja 1 µg/mL vastasi [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA -potilasannoksen pitoisuutta. Näytteet mitattiin Gemini-kolonnilla käyttäen PSMA-617:lle optimoitua gradienttia (kuva 11, gradientti 1).

### 6.1.3 $^{177}\text{Lu}$ :n gammaspektri

Lutetium-177:n gammaspektri määritettiin sairaalan Hidex-gammalaskurilla. Laitteella ei pystynyt tekemään tarkkaa gamma-analyysi vaan lähinnä suuntaa-antavan isotoopin tunnistamisen. Mittauksilla haluttiin selvittää myös, näkyykö kantajallisen - ja kantaja-vapaan  $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeen spektreissä eroavaisuuksia sairaalan laitteiston mittaustarkkuudella. Kokeissa mitattiin potilaskäyttöön valmistettujen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE ja  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC -radiolääkkeiden gammaspektrit:  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE:n valmistuksessa käytetään kantajallista  $^{177}\text{Lu}$ -isotooppia (AAA, LUTHATERA®) ja  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC:n valmistuksessa käytetään kantajavapaata  $^{177}\text{Lu}$ -isotooppia (ITG, EndolucinBeta). Molempien radiolääkkeen laadunvalvontanäytteistä otettiin 2 µL:n osanäytteet koeputkeen ja mitattiin gammalaskurilla.  $^{177}\text{Lu}$ -isotoopin tarkastelussa käytettiin laitteen energiaikkunaa 0-500keV.

### 6.1.4 TLC-menetelmän yhtenäistäminen $^{177}\text{Lu}$ - ja $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeille

Tutkimuksessa selvitettiin voiko  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOCin ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden kanssa käyttää samaa TLC-menetelmää kolloidien määrittämiseen. Erityisesti tutkittiin, onko  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOCin laadunvalvonnassa käytetty TLC-skanneri (LabLogic, SR-1B), PS Plastic/PMT -detektori ja ajoliuos (1 M ammoniumasetaatti-MeOH) soveltuvia  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontaan. TLC-skannerin detektori (PS Plastic/PMT) havaitsi hyvin  $^{177}\text{Lu}$ -isotoopin beetasäteilyä, mutta nyt selvittiin, kuinka hyvin detektori havaitsee  $^{68}\text{Ga}$ -isotoopin gammasäteilyä. TLC-levyjen skannausnopeutta ja detektorin jännitettä tutkittiin, jotta saataisiin optimoitua  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontamenetelmiä mittaustarkkuuden, -herkkyyden ja ajankäytön suhteen, ja selvitettyä TLC-menetelmän lineaarisuutta  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeille.

Tutkimuksessa käytettiin potilaskäyttöön tehtyjen  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA- ja  $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC radiolääkkeiden laadunvalvontanäytteitä. Laadunvalvontanäytteiden aktiivisuudet olivat 51,4 kBq – 241,9 kBq. TLC-menetelmän lineaarisuutta tutkittiin *skannausnopeuden ja detektorin jännitteen* suhteen. Näytteet valmistettiin applikoimalla samalle TLC-levylle 2

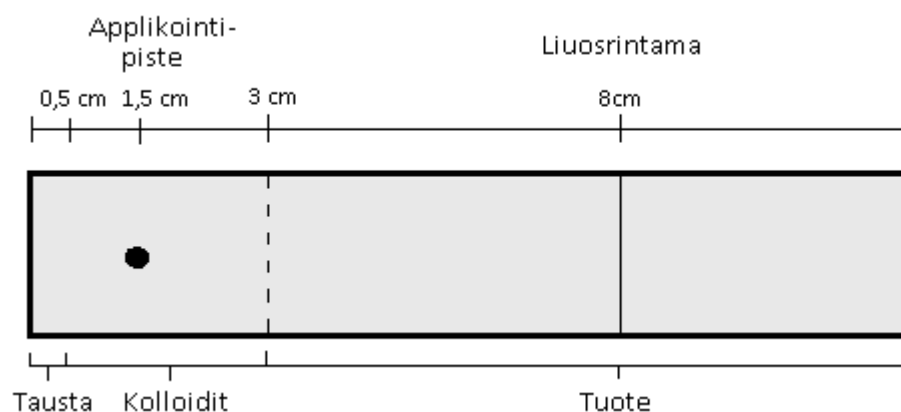


$\mu\text{L}$ :n pisaroita tutkittavaa  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkettä erilaisilla laimennussuhteilla ja mittaamalla levyt suoraan ilman ajoliuosten vaikutusta. TLC-levylle applikoitiin maksimissaan kolme pisaraa 2,5 cm:n välein ja sama levy mitattiin useampana ajanhetkenä  $^{68}\text{Ga}$ -isotoopin aktiivisuuden pienentyessä. Näin saatiin mitattua suuri joukko aktiivisuudeltaan eroavia pisteitä. Applikointipisteiden aktiivisuudet korjattiin puoliintumisajan suhteen mittaussajankohdalle.

Applikointipisteiden aktiivisuudet mittaushetkinä olivat 75 Bq -241,9 kBq. Levyjä mitattiin jännitteillä 800 V, 850 V ja 900 V ja skannausnopeuksilla 0,5 mm/s, 1 mm/s, 1,5 mm/s ja 2 mm/s. Skannausnopeuksien 1,5 mm/s ja 2 mm/s tutkiminen kuitenkin hylättiin alustavien mittausten jälkeen, koska laitteiston mittaustarkkuus heikkeni selvästi.

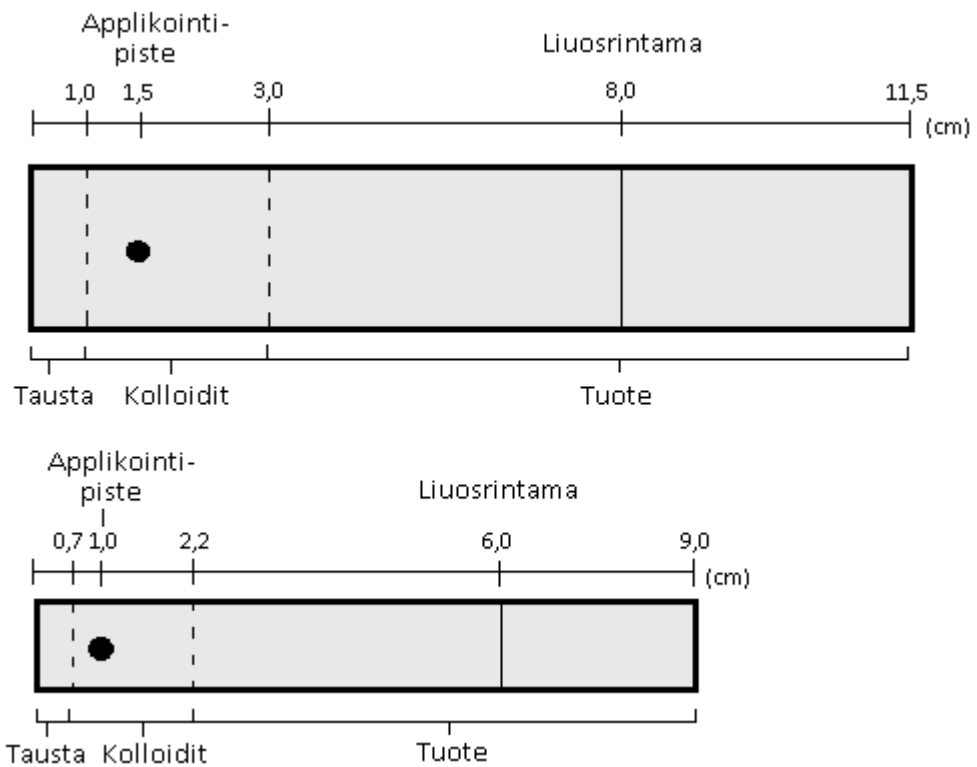
$^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden kanssa oli aiemmin käytetty ammoniumasetaatti-MeOH -liuosta, joka erosi testattavasta ajoliuoksesta ainoastaan pitoisuutensa suhteen: Lu-DOTATOC:n laadunvalvonnassa oli käytetty 1 M ammoniumasetaattia laimennettuna metanoliin suhteessa 1:1 (v/v), kun taas  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvonnassa oli käytetty 2 M ammoniumasetaattia laimennettuna metanoliin suhteessa 1:1 (v/v).

*Ajoliuoksen vaikutusta* tutkittaessa valmistettiin näytteet pipetoimalla 2  $\mu\text{L}$   $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkettä Varianin iTLC-SG -levylle ja ajamalla rinnakkaisia TLC-ajoja kahdella erivahvuisella ammoniumasetaatti-MeOH -liuoksella. TLC-levyt olivat 2 cm leveitä, 11,5 cm pitkiä ja ne oli kuivatettu (30 min,  $110^{\circ}\text{C}$ ) ja säilytetty eksikaattorissa. Näytteen applikointi tehtiin 1,5 cm:n korkeudelle ja liuosrintaman annettiin nousta 8 cm korkeudelle. Applikointipisteen ja liuosrintaman päätepisteen kohdat merkattiin lyijykynällä levyjen reunaan. TLC-kammioina käytettiin 400 ml:n kaatonokattomia dekanterilaseja, joiden kansina toimivat kellolasit. Ajoliuosta laitettiin noin 10 ml kammion pohjalle. Kun liuosrintamat olivat rinnakkaisissa näytteissä nousseet 8 cm, nostettiin TLC-levyt kammioistaan ja mitattiin peräjälkeen TLC-levy-skannerilla useampana ajanhetkenä. Mittauksissa käytettiin  $R_f$ -arvoa 0,23 TLC-levyn rajaamiseen, jolloin kolloidisten epäpuhtauksien osuus laskettiin levyn alusta etäisyydelle 3 cm ja tuotteiden osuus laskettiin 3 cm:n kohdalta levyn loppuun. TLC-levyn rajaukset on esitetty kuvassa 13.

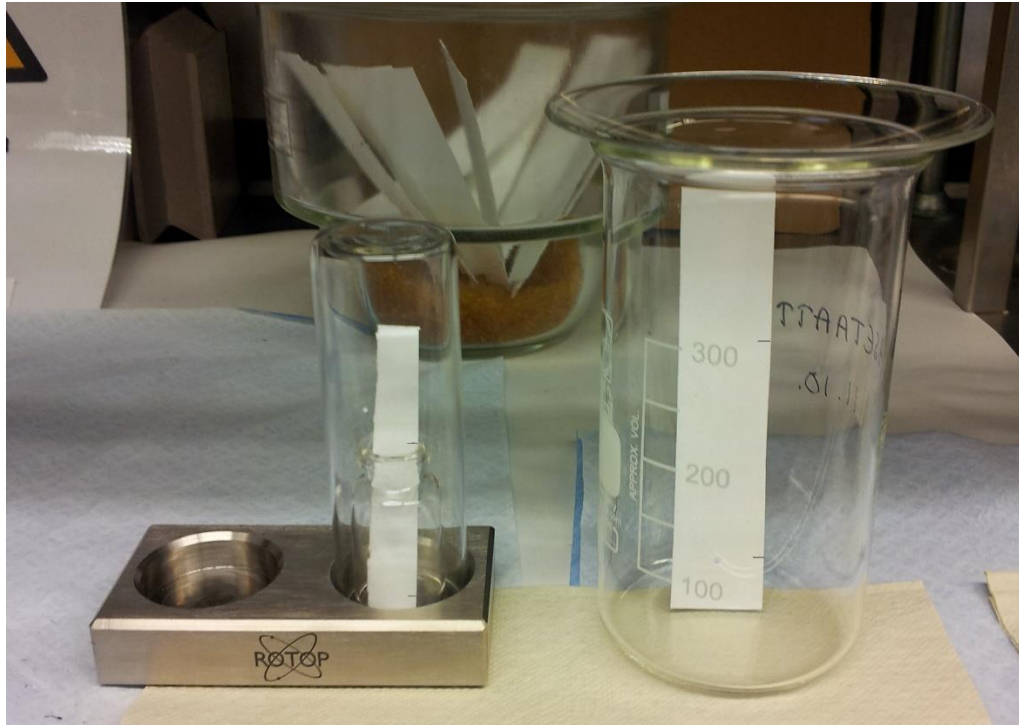


**Kuva 13.** TLC-levyjen analysoinnissa tehdyt rajaukset määrittäessä Ga-PSMA:n ja -DOTANOCin radiokemiallista puhtautta. Mittauksissa käytetty Varianin iTLC-SG-levyjä ja  $R_f$ -arvoa 0,23.

$^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden avulla testattiin *ROTOP valmistajan QC-iTLC -laadunvalvontasettiä*. Laadunvalvontasetin avulla tutkittiin, pystyisikö TLC-laitteistoa pienentämään, jolloin menetelmän mittausaika nopeutuisi, kuluisi vähemmän TLC-ajoliuoksia ja kemikaalijätteen määrä vähenisi. Tutkimuksessa määritettiin [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA:n ja -DOTA-NOCin kolloidiset epäpuhtaudet tekemällä TLC-ajot 1M ammoniasetaatti-MeOH -liuoksessa, jolloin kolloidiset epäpuhtaudet jäävät applikointipisteeseen ja tuote nousee liuosrintaman mukana.  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeistä ajettiin rinnakkaiset TLC-ajot ROTOP QC-iTLC -laadunvalvontasetillä ("minikitillä") ja HUS-laboratorion validoidulla menetelmällä. ROTOPin minikitin kammioihin laitettiin 1 mL ajoliuosta ja kammioden päälle asetettiin lasikuvut TLC-ajojen ajaksi. Minikitin kanssa käytettiin 1x9 cm iTLC-SG-levyjä, joihin applikoitiin 2  $\mu\text{L}$  näytepisara 1 cm korkeudelle ja liuosrintaman annettiin nousta 6 cm:n korkeudelle. Näytepisaran tilavuuden vaikutusta tutkittiin vielä autoradiografian avulla, mittaamalla 1  $\mu\text{L}$  ja 2  $\mu\text{L}$  [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-näytteiden aktiivisuusjakaumat 1x9 cm iTLC-SG-levyillä. Kaikki TLC-levyjen rajaukset tehtiin käyttäen  $R_f$ -arvoa 0,23. Kuvassa 14 on esitetty, miten rajaukset tehtiin ROTOPin minikitin ja validoidun menetelmän kanssa käytettyihin TLC-levyihin. Kuvassa 15 on esitetty vierekkäin tutkimuksessa käytetyt TLC-kammiot.



Kuva 14. Yllä validoidun menetelmän kanssa käytettyjen 2 x 11,5 cm iTLC-SG -levyjen rajaukset. Alla ROTOP minikitin kanssa käytettyjen 1 x 9 cm iTLC-SG -levyjen rajaukset. Rajauksissa käytetty  $R_f$  -arvoa 0,23.



Kuva 15. Vasemmalla ROTOP -minikitin TLC-kammio ja oikealla HUS-laboratorion validoidun menetelmän TLC-kammio.

## 6.2 Metallikontaminaatiot

### 6.2.1 Rauta(III)kontaminaation vaikutus radiolääkkeiden retentioaikaan

DOTANOCin ja PSMA-HBED-peptidien sekä DOTATOCin ja PSMA-617-peptidien leimaantumista Fe(III):lla selvitettiin peptidien puskuriliuoksissa. DOTANOCin ja PSMA-HBED-peptidien leimaantumista tutkittiin käyttäen 0,2 M asetaattipuskuria, kun taas DOTATOCin ja PSMA-617-peptidien leimaantumista tutkittiin askorbiinihappopuskurissa. Askorbaattipuskuri valmistettiin itse 20 ml:n Corning-putkeen liuottamalla 1,2 g natriumaskorbaattia ja 300 mg askorbiinihappoa 15 ml:aan TraceSelect –vettä. Leimaukseen käytettävä rauta(III)-liuos valmistettiin liuottamalla 1 g kiinteää Fe(III)-kloridia 1 ml:aan 0,1 M suolahappoa. Jokaisesta tutkittavasta aineesta valmistettiin sekä raudalla leimattu että leimaamaton näyte. Leimaukset tehtiin noin 0,5 ml:n tilavuudessa ja leimaukseen käytettiin 10-kertainen Fe(III)-ainemäärä peptidin ainemäärään nähden. Taulukossa 9 on esitetty näytteiden valmistustavat.

Näytteitä lämmitettiin IKA:n Dry Block -lämpöhauteella 10 minuuttia 95 °C:ssa leimautumisen varmistamiseksi. Leimauksen jälkeen ilman rautaa ja raudalla leimatut lähtöaineet ajetaan HPLC:llä ensin Kinetex-kolonnilla ja sen jälkeen Gemini-kolonnilla käyttäen yhdisteille optimoituja gradientteja.

**Taulukko 9. Puskuriliuosten ja Fe(III)-leimausten valmistus DOTA-NOC-, DOTA-TOC-, PSMA-617- ja PSMA-11 -referensseille.**

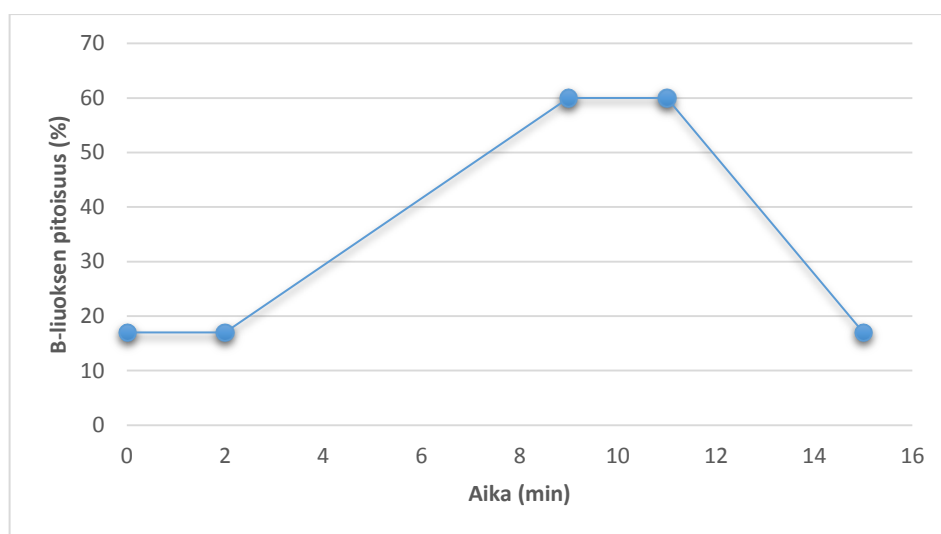
Näyte	Valmistus
Askorbaattipuskuri	-1,2g Natriumaskorbaatti -300mg Askorbiinihappo -15 ml TraceSELECT
Fe(III)Cl-liuos	-1 mg Fe(III)Cl -1mL 0,1 M HCl -1:1000 laimennos (0,1 M HCl)
Fe(III)-leimattu DOTANOC	-10uL DOTANOC (1mg/mL, TraceSELECT ) -11,1 uL Fe(III)Cl-liuosta -500uL 0,2 M asetaattipuskuria
Leimaamaton DOTANOC	-10uL DOTANOC (1mg/mL, TraceSELECT) -500uL 0,2 M asetaattipuskuri
Fe(III)-leimattu DOTATOC	-20 uL DOTATOC (0,5 mg/mL, TraceSELECT) -11,4 uL Fe(III)Cl-liuosta -500uL askorbaattipuskuria
Leimaamaton DOTATOC	-21 uL DOTATOC (0,5 mg/mL, TraceSELECT) - 500uL askorbaattipuskuria
Fe(III)-leimattu PSMA-11	-10uL PSMA-11 (1mg/mL, TraceSELECT) -17,1 uL Fe(III)Cl-liuosta -500uL 0,1 M asetaatti-HCl puskuria
Leimaamaton PSMA-11	-10uL DOTANOC (1mg/mL, TraceSELECT) -500uL 0,1 M asetaatti-HCl puskuri
Fe(III)-leimattu PSMA-617	-20 uL PSMA-617 (0,5 mg/mL, TraceSELECT) - 15,6uL Fe(III)Cl-liuosta -500 uL askorbaattipuskuria
Leimaamaton PSMA-617	-21 uL PSMA-617 (0,5 mg/mL, TraceSELECT) -500 uL askorbaattipuskuria

## 7. Tulokset

### 7.1 $^{177}\text{Lu}$ ja $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontamenetelmät

#### 7.1.1 HPLC-menetelmä [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA:lle

Gradientilla 1 (kuva 11), missä B-liuoksen pitoisuus muuttui 17 %:sta 60 %:iin, saatiin parhaat tulokset. Gemini-kolonnilla [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA eluoitui keskimäärin ajassa 7,4 min ja häntimistekijä oli 0,92. Menetelmän kokonaiskesto oli 15 minuuttia ja virtausnopeus oli 0,6 ml/min, jolloin laitteiston paine oli 200-230 bar. PSMA-617-lähtöaineelle retentioajan keskiarvo oli 7,3 min ja häntimistekijä oli 1,31. Menetelmää kokeiltiin myös Kinetex-kolonnilla käyttäen alempaa virtausnopeutta (0,45 ml/min, ~200 bar), jolloin PSMA-617-lähtöaineen retentioajaksi tuli 7,4 min. Optimoitu gradientti on esitetty kuvassa 16 ja muihin gradientteihin liittyneet huomiot on esitetty liitteessä 1.



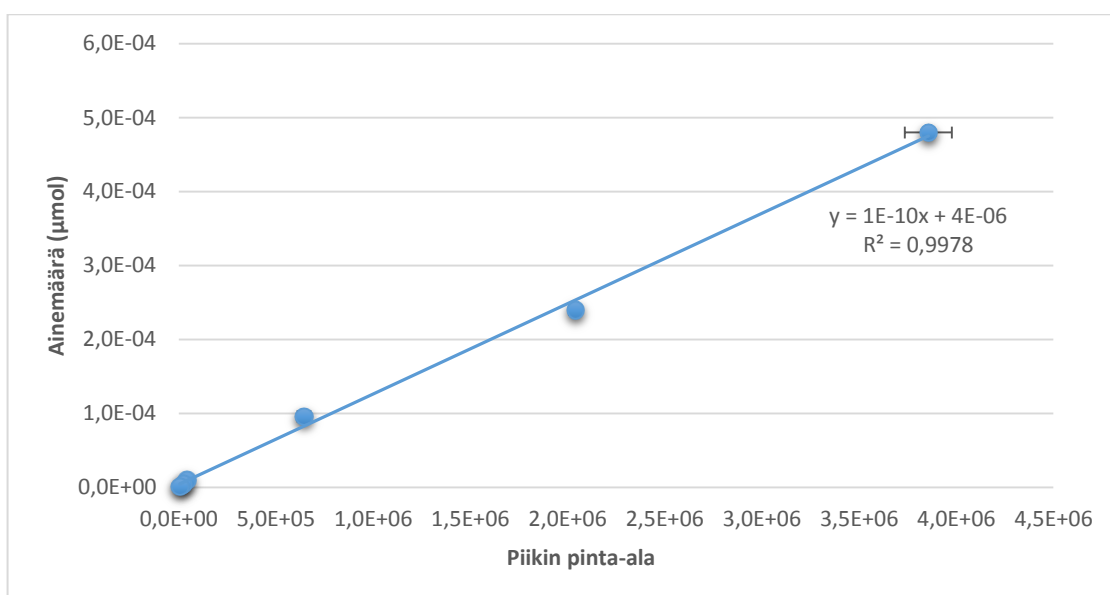
Kuva 16. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA:lle optimoitu gradientti. Kuvaajassa on esitetty B-liuoksen pitoisuus ajan funktiona. Menetelmässä on käytetty kahta liuosta: 0,1 % TFA-vesi (A-liuos) ja 0,1 % TFA-asetonitrili (B-liuos). Ajoliuoksen liuosnopeus 0,6 mL/min ja kolonnin lämpötila 40 °C.

### 7.1.2 PSMA-617 massakvantitointi HPLC:n UV-detektorille

Gemini –kolonnilla mitatun standardisarjan ainemäärien ja piikkien pinta-alojen perusteella muodostettiin massakvantitointisuora PSMA-617:lle. Massakvantitointisuorassa PSMA-617:n ainemäärä on esitetty UV-detektorin piikin pinta-alan funktiona aallonpituudella 220 nm. Standardisarjasta oli lineaarinen ainemäärillä ( $9,6 \cdot 10^{-4} - 4,8 \cdot 10^{-1}$ ) mol, koska korrelaatiokerroin oli 0,9978. Pienimpien ainemäärien tuloksissa oli selvempää hajontaa, mikä ilmenee jäännöshajonnan korkeammissa arvoissa. Mittaustulokset ja niiden käsittely on esitetty taulukossa 10. Massakvantitointisuora on esitetty kuvassa 17.

**Taulukko 10. PSMA-617 standardisarjan tuloksista lasketut keskiarvot (KA), keskihajonnat (STD) ja jäännöshajonnat (RSTD). Kohdissa (\*) n=3, muuten n=5.**

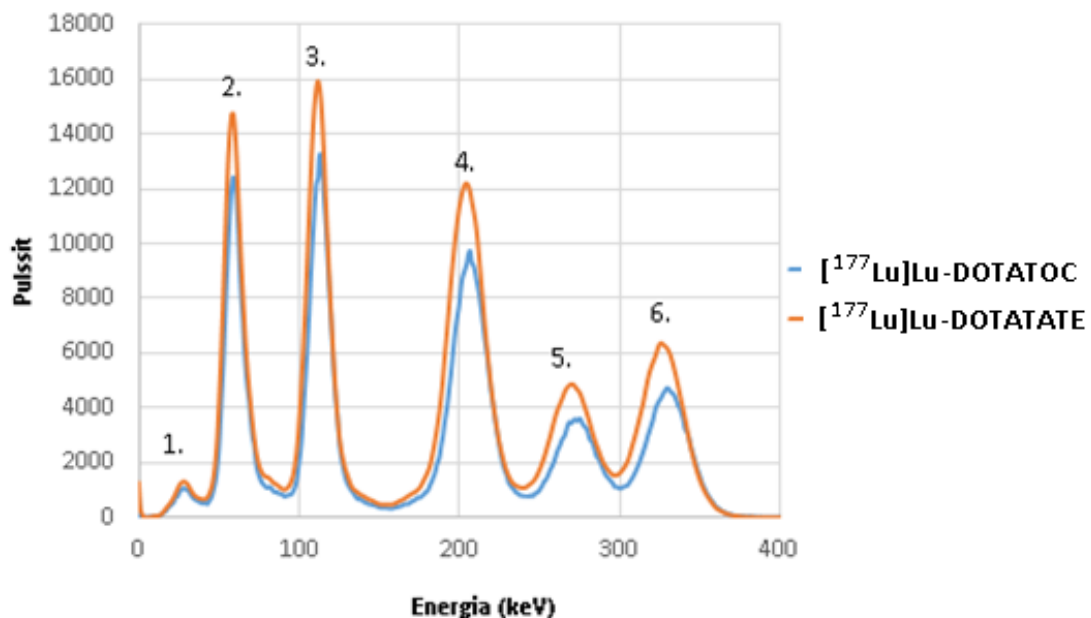
c (µg/µL)	n (µmol)	Piikin pinta-alan KA	Piikin pinta-alan STD	Piikin pinta-alan RSTD (%)
0,05	4,80E-01	3856730,80	120972,84	3,14
0,025	2,40E-01	2040134,20	29915,27	1,47
0,01	9,60E-02	644253,75	31153,79	4,84
0,001	9,60E-03	41836,00	3227,65	7,72 *
0,0005	4,80E-03	24025,33	4179,11	17,39 *
0,0001	9,60E-04	5227,25	771,85	14,77 *



**Kuva 17. PSMA-617 massakvantitointi UV-detektorilla aallonpituudella 220 nm.**

### 7.1.3 Lutetium-177:n gammaspektri

Hidex - gammalaskuri antoi [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATATE:n ja -DOTATOCin pulssimäärät energian funktiona. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu -DOTATATE:n ja [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu -DOTATOCin spektreissä ei havaittu eroja (kuva 18). Hidex-gammalaskurin mittaustarkkuus ei riittänyt erottamaan kantajallisen - ja kantaja-vapaan  $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeiden spektrejä toisistaan.  $^{177}\text{Lu}$ :n karakterisoinnin kannalta oleelliset gammapiikit 113 keV ja 208 keV energioilla olivat kuitenkin havaittavissa (piikit 3 ja 4, kuva 15). Kuvan 18 gammaspektreistä havaitaan myös Auger elektroneja (42-46 keV, piikki 1),  $K\alpha_2$ - ja  $K\alpha_1$ -röntgensäteitä (54,7 keV ja 55,7 keV, piikki 2), mahdollista muoviputkesta emittoituvaa sekundääristä säteilyä (270-284 keV, piikki 5)<sup>78</sup> ja matalan intensiteetin gammasäteilyä (321 keV,  $I_\gamma=0,219\%$ , piikki 6).<sup>34</sup>



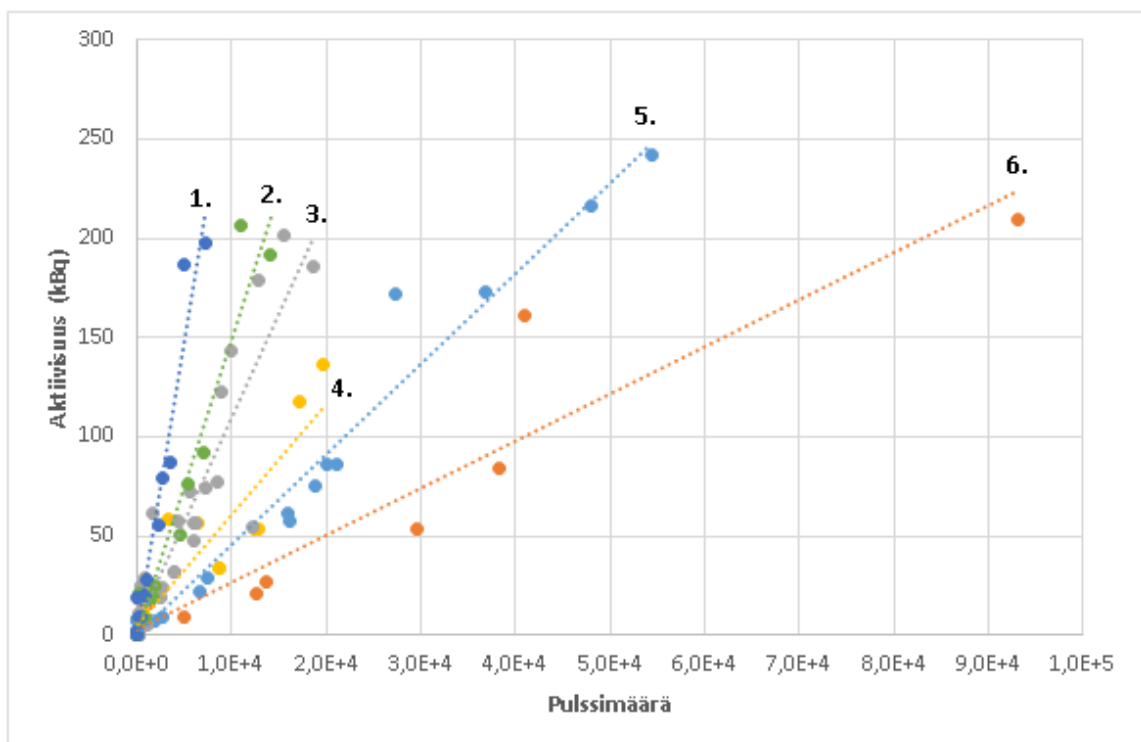
Kuva 18.  $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATATE:n ja -DOTATOCin gammaspektrit Hidex-gammalaskurilla mitattuna. Piikit 1-6 ovat kirjallisuuden avulla tunnistettu seuraavasti: (1) 42-46 keV,  $^{177}\text{Lu}$ , Auger elektronit, (2) 54,6 keV, 55,7 keV,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $K\alpha_2+K\alpha_1$  röntgensäteet, (3) 113 keV,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $\gamma$  (6,4 %), (4) 208,4 keV,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $\gamma$  (11 %), (5) 270-284 keV, mahdollisesti muoviputkesta emittoituvaa sekundäärinen säteily<sup>78</sup>, (6) 321 keV  $^{177}\text{Lu}$ ,  $\gamma$  (0,219 %)<sup>34</sup>



#### 7.1.4 TLC-menetelmän yhtenäistäminen $^{68}\text{Ga}$ - j -radiolääkkeille

##### 7.1.4.1 TLC-levyn skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutus

TLC-kokeissa, joissa tutkittiin tarkemmin skannausnopeutta (0,5 mm/s ja 1mm/s) ja -jännitettä (800 V, 850 V ja 900 V), mitattiin lukuisia  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA ja  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOC -näytteitä applikoimalla eri kokoisia pisaroita ja erilaisia laimennoksia tuotteista iTLC-SG-levylle. Näytteiden kromatogrammeista luettiin piikkien pulssit ja näytteiden aktiivisuudet korjattiin puoliintumisajan suhteen. Tulokset ovat kuvassa 19, jossa  $^{68}\text{Ga}$ -näytteen aktiivisuus on esitetty pulssimäärän funktiona.



Kuva 19. Skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutus pulsseihin  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden ( $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA:n ja  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOC) TLC-mittauksissa. Kuvaajien 1-6 mittausjännite, skannausnopeus, lineaarisovituksen korrelaatiokerroin ja suoran yhtälö olivat: (1) 800 V, 1 mm/s, 0,958,  $y=0,0291x$ ; (2) 800 V, 0,5 mm/s, 0,948,  $y=0,0149x$ ; (3) 850 V, 1 mm/s, 0,843,  $y=0,0109x$ ; (4) 850 V, 0,5 mm/s, 0,806,  $y=0,006x$ ; (5) 900 V, 1 mm/s, 0,974,  $y=0,0046x$ ; (6) 900 V, 0,5 mm/s, 0,916,  $y=0,0024x$ .

Skannausnopeuden kasvattaminen laski pulssien määrää selvästi ja jännitteen kasvattaminen nosti pulssien määrää selvästi. Kymmenentuhatta pulssia ylittyi mittauksissa lukuun ottamatta käytettäessä alhaisinta (800 V) jännitettä 1 mm/s skannausnopeudella.

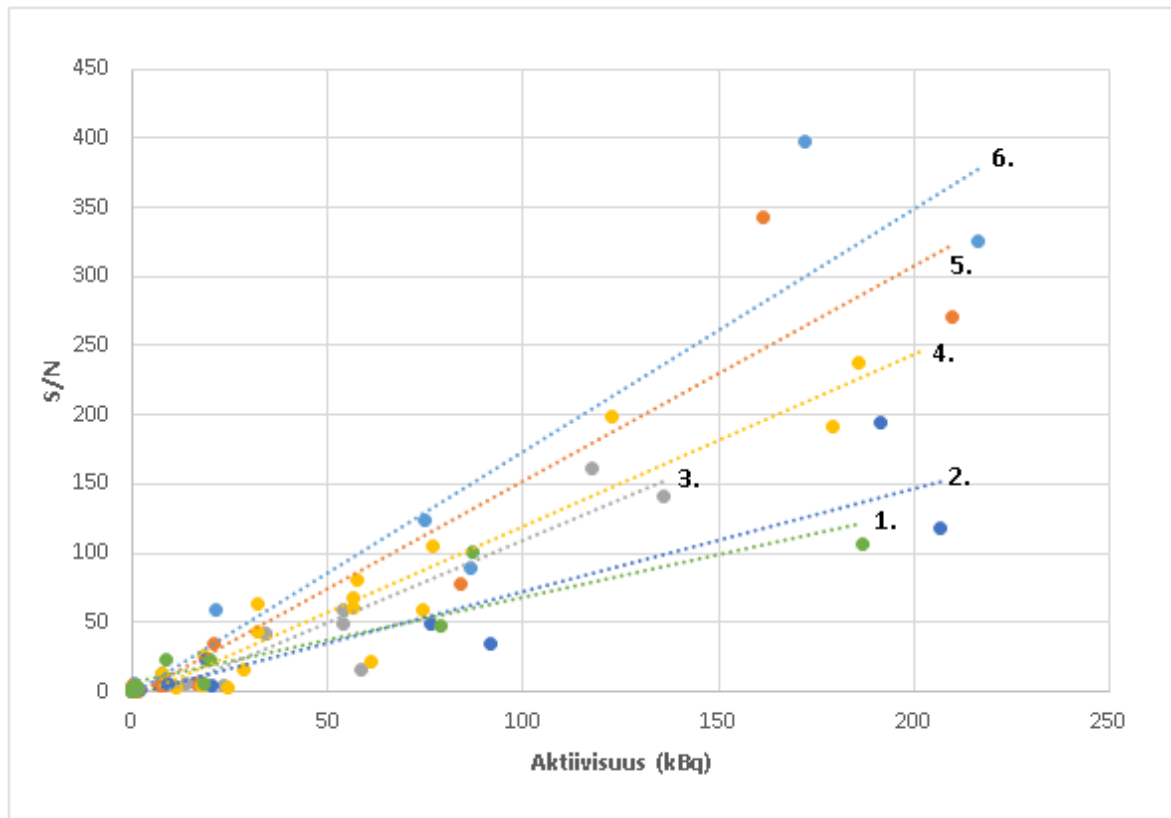
Laimentamattomista laadunvalvontanäytteistä TLC-levyille applikoitujen pisaroiden aktiivisuudet vaihtelivat välillä 51,4 kBq – 241,9 kBq. Taulukossa 11 on esitetty, miten pulssimäärät ja pulssimäärien virheiden prosenttiosuudet muuttuivat skannausjännitteen ja -nopeuden myötä, kun mitattiin <sup>68</sup>Ga-radiolääkkeiden 50 kBq, 100 kBq ja 200 kBq näytteitä.

**Taulukko 11. Skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutus pulsseihin ja niiden virheisiin <sup>68</sup>Ga-radiolääkkeiden ([<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA:n ja [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTANOC) TLC-mittauksissa. Pulssimäärät on laskettu kuvan 16 lineaarisovitusten yhtälöiden avulla ja pulssien virheet ( $\sigma$ -pulssit) ovat pulssimäärien neliöjuuret.  $\sigma$  (%) on pulssimäärien virheiden prosenttiosuus pulssimäärästä.**

TLC-skannerin asetukset	Skannausjännite (V)	800	800	850	850	900	900
	Skannausnopeus (mm/s)	1	0,5	1	0,5	1	0,5
TLC-näytteen aktiivisuus: 50 kBq	Pulssimäärä	1730	3406	4413	8025	10844	19774
	$\sigma$ -pulssit	42	58	66	90	104	141
	$\sigma$ (%)	2,4	1,7	1,5	1,1	1,0	0,7
TLC-näytteen aktiivisuus: 100 kBq	Pulssimäärä	3437	6762	9175	17116	21713	40607
	$\sigma$ -pulssit	59	82	96	131	147	202
	$\sigma$ (%)	1,7	1,2	1,0	0,8	0,7	0,5
TLC-näytteen aktiivisuus: 200 kBq	Pulssimäärä	6850	13473	18699	35297	43452	82274
	$\sigma$ -pulssit	83	116	137	188	208	287
	$\sigma$ (%)	1,2	0,9	0,7	0,5	0,5	0,3

Skannausjännitteellä 900 V pulssimäärien prosentuaaliset virheet olivat  $\leq 1$  %. ja skannausjännitteellä 850 V prosentuaaliset virheet olivat  $\leq 1,5$  %. Tuoreiden laadunvalvontanäytteiden aktiivisuudet olivat kuitenkin useimmiten  $\sim 200$  kBq/2  $\mu$ L, jolloin 850 V skannausjännitteellä päästiin myös alle 1 % virheeseen. Virheiden prosenttiosuudet skannausnopeuksilla 0,5 mm/s ja 1 mm/s olivat vain 0,2 prosenttiyksikön päässä toisistaan, kun mitattiin 100-200 kBq:n näytteitä skannausjännitteillä 850 V ja 900 V. Tällöin nopeus 1 mm/s on hyödyllisempi, koska sitä käyttäen mittausaika on puolet lyhyempi. Skannausnopeuden 0,5 mm/s edut kuitenkin korostuvat pulssimäärien pienentyessä, joten sen käyttäminen pienien aktiivisuuksien mittauksissa voi olla kannattavaa.

Kuvassa 20 on esitetty skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutus S/N -arvoon, joka ilmaisee, kuinka hyvin piikki erottuu kohinasta.



Kuva 20. Skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutus S/N -arvoon  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden radiolääkkeiden ( $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA:n ja  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOC) TLC-mittauksissa. Kuvaajien 1-6 mittausjännite, skannausnopeus, lineaarisovituksen korrelaatiokerroin ja suoran yhtälö olivat: (1) 800 V, 1 mm/s, 0,825,  $y=0,673x$ ; (2) 800 V, 0,5 mm/s, 0,861,  $y=0,731x$ ; (3) 850 V, 0,5 mm/s, 0,868,  $y=1,078x$ ; (4) 850 V, 1 mm/s, 0,907,  $y=1,201x$ ; (5) 900 V, 0,5 mm/s, 0,904,  $y=1,532x$ ; (6) 900 V, 1 mm/s, 0,925,  $y=1,741x$ .

Jännitteellä on selvempi vaikutus S/N-arvoon, kuin skannausnopeudella. Suurimmat S/N-arvot saatiin jännitteellä 900 V, koska S/N-arvo kasvoi jännitteen kasvaessa. Taulukossa 12 on esitetty kuvan 17 lineaarisovitusten yhtälöillä lasketut herkkyysrajan ( $S/N=3$ ) ja määrittäysrajan ( $S/N=10$ ) arvot eri skannausnopeuksilla ja -jännitteillä.

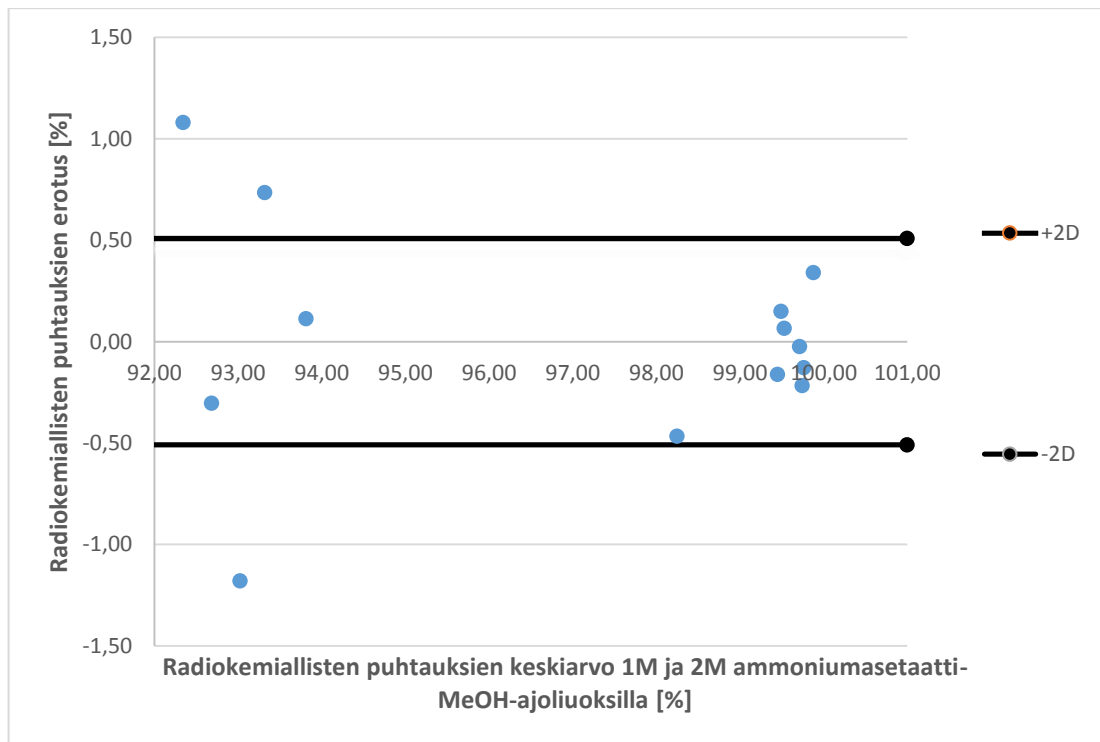
Taulukko 12. Skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutus S/N-arvoihin  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden ( $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA:n ja  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOC) TLC-mittauksissa. Laitteiston herkkyysraja ( $S/N=3$ ) ja määrittäysraja ( $S/N=10$ ) on laskettu kuvan 17 lineaarisovitusten yhtälöiden avulla.

Skannausjännite (V)	800	800	850	850	900	900
Skannausnopeus (mm/s)	1	0,5	1	0,5	1	0,5
Suoran yhtälö (kuva 17)	$y=0,673x$	$y=0,731x$	$y=1,201x$	$y=1,078x$	$y=1,741x$	$y=1,532x$
Herkkyysraja ( $S/N=3$ ) [kBq]	4,46	4,10	2,50	2,78	1,72	1,96
Määrittäysraja ( $S/N=10$ ) [kBq]	14,86	13,68	8,33	9,28	5,74	6,53

Taulukosta 12 huomaa, että skannausnopeuksien 0,5 mm/s ja 1 mm/s välillä ei ole suurta eroa S/N-arvoissa. Tällöin skannausnopeuden 1 mm/s käyttö on hyödyllisempää. Herkkyys- ja määrittäysrajat ovat melko suuret jopa 900 V skannausjännitteellä, sillä laitteiston tulisi pystyä määrittämään 1 % epäpuhtaudet 200 MBq/10 ml – 1500 MBq/10 ml radiolääkkeistä. Tällöin mitattava aktiivisuus on 2 µL applikoinnilla olisi 400 Bq – 3000 Bq ja 900 V skannausjännitteellä pystytään havaitsemaan vasta 1720 Bq:n aktiivisuus, joten ei herkkyys ei riitä kaikille näytteille. Skannausjännitteellä 850 V pystytään havaitsemaan vasta 2500 Bq:n aktiivisuus ja 800 V skannausjännitteellä pystytään havaitsemaan vasta 4100 Bq:n aktiivisuus. Melko hyvistä korrelaatiokertoimista huolimatta lineaarisovitukset eivät kuitenkaan sovi hyvin yhteen alhaisaktiivisten näytteiden tulosten kanssa. Mittapisteistä luettuna alhaisimmat aktiivisuudet, joilla herkkyysrajat ylitettiin, olivat: 596 Bq käyttäen 900 V skannausjännitettä, 778 Bq käyttäen 850 V skannausjännitettä ja 871 Bq 800 V skannausjännitteellä. Nämä herkkyydet olisivat huomattavasti paremmat ja suurentamalla applikointitilavuus 3 µL:ksi 900 V skannausjännitteen herkkyys riittäisi <sup>68</sup>Ga-radiolääkkeiden laadunvalvontaan, koska alimmat aktiivisuudet olisivat ≥600 Bq. Tuloksen vahvistaminen vaatii kuitenkin lisää kokeita alhaisaktiivisilla <sup>68</sup>Ga-radiolääkkeillä, jotta S/N-arvon havaitusta lineaarisesta käyttäytymisestä poikkeaminen alhaisissa aktiivisuuksissa voidaan todeta.

#### 7.1.4.2 Ajoliuoksen vahvuuden vaikutus

[<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA- ja [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTANOC-radiolääkkeistä ajettiin useampana ajanhetkenä rinnakkaiset TLC-ajot kahdella menetelmällä. Menetelmät olivat muuten samanlaiset, mutta niissä käytettiin erivahvuisia (1 M ja 2 M) ammoniumasetaatti-MeOH-ajoliuoksia. Yksi mittaus kesti noin minuutin, joten rinnakkaiset näytteet eivät olleet täysin samalta ajanhetkeltä. Siitä aiheutuva mittausvirhe oletettiin kuitenkin pieneksi. Menetelmiä verrattiin toisiinsa laskemalla saaduista rinnakkaisista radiokemiallista puhtauksista keskiarvot ja erotukset, ja esittämällä erotukset keskiarvojen funktiona pistekaaviossa (kuva 21) Bland JM *et al* (1986)<sup>79</sup> menetelmän mukaisesti. Kaavioon merkattiin pistejoukolle ylä- ja alarajat käyttäen kaksinkertaista keskihajontaa ±2D (standard deviation).

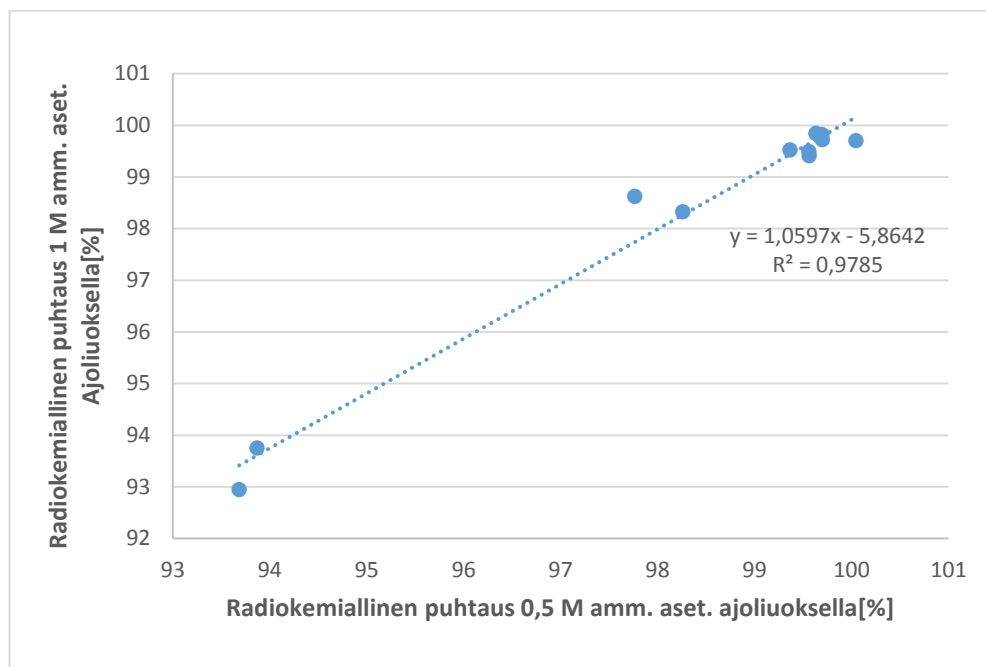


**Kuva 21.  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA}$ :n radiokemiallisen puhtauden erotus eri vahvuisia ammoniumasetaatti-MeOH -ajoliuoksilla radiokemiallisen puhtauden keskiarvon funktiona.**

Kuvasta 21 nähdään, että suurin osa mittapisteistä on kaksinkertaisen standardipoikkeman rajoissa ja hajaannusta esiintyy lähinnä alhaisen puhtauden (>94 %) näytteissä. Alhaisen radiokemiallisen puhtauden näytteet ovat tässä tapauksessa myös alhaisemman aktiivisuuden näytteitä, jolloin hajaannusta aiheuttaa myös pulssien vähäisyys. Korkeamman aktiivisuuden ja puhtauden näytteistä kuitenkin huomataan, että menetelmät ovat hyvin yhdenmukaiset. Radiokemiallisen puhtauden ylittäessä 94 % suurin erotus menetelmien välillä oli 0,47 %.

Normaalissa laadunvalvonnassa näytteet ovat tuoreita ja aktiivisuudet ovat korkeita, jolloin laitteiston herkkyys riittää ja menetelmät käyttäytyvät yhdenmukaisesti. Tällöin 1 M ammoniumasetaatti-MeOH-ajoliuoksen käyttäminen on kannattavampaa, koska sitä käytetään myös  $^{177}\text{Lu}$ -radiolääkkeiden laadunvalvonnassa ja reagensseja kuluu liuosten valmistamisessa vähemmän. Yli 93 % radiokemiallisista puhtauksista muodostettiin myös kuvaaja eri menetelmillä saatujen radiokemiallisen puhtauksien suhteesta. Kuvassa 22 on esitetty pystyakselilla  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA}$ :n radiokemiallinen puhtaus 2 M ammoniumasetaatti-MeOH-liuoksella ja vaaka-akselilla  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA}$ :n radiokemiallinen

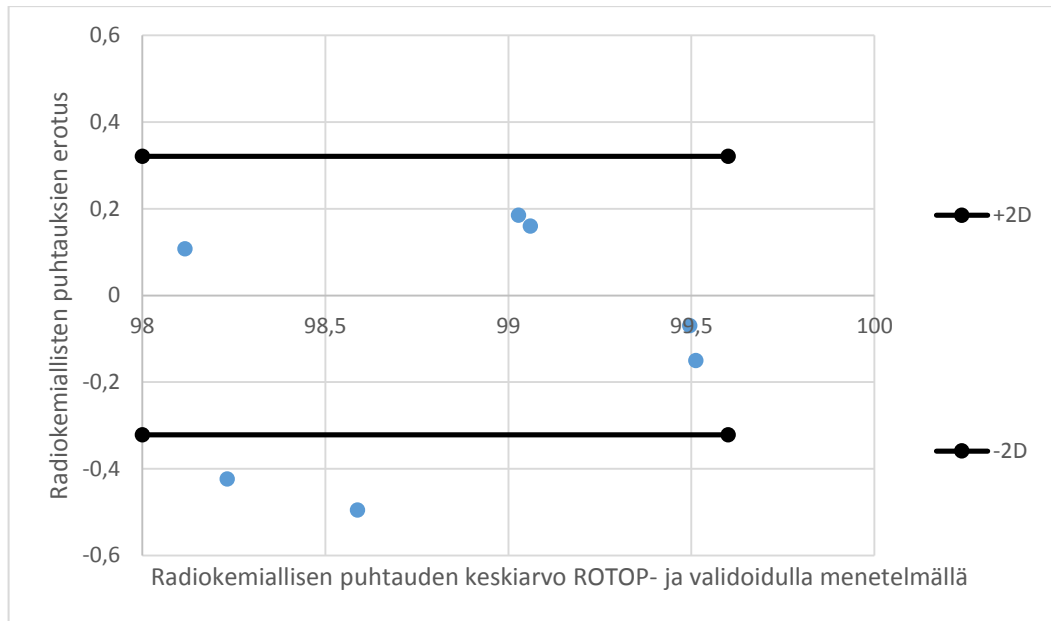
puhtaus 1 M ammoniumasetaatti-MeOH-liuoksella. Menetelmien välinen korrelaatiokerroin oli 0,9785.



Kuva 22. [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA:n radiokemiallinen puhtaus vertaillen eri vahvuisia ammoniumasetaatti-MeOH -ajoliuoksia.

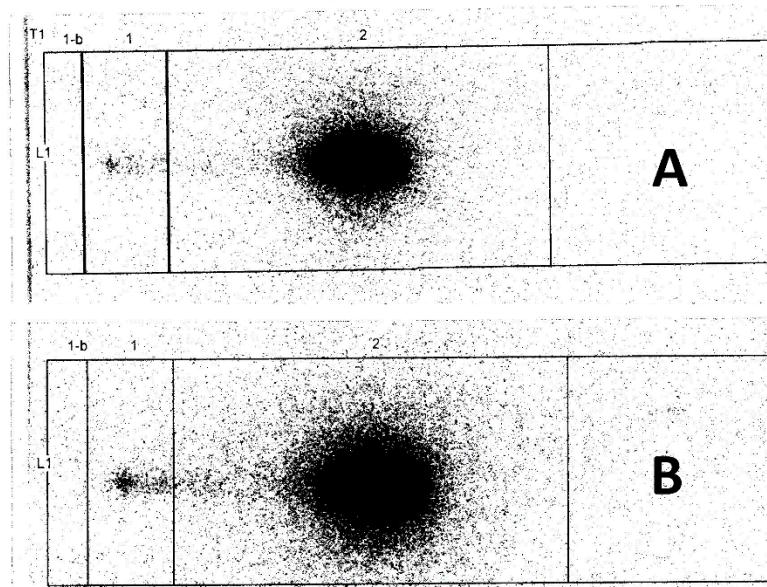
#### 7.1.4.3 ROTOP QC iTLC –laadunvalvontasetin toimivuus

ROTOP QC-iTLC -setin käyttöä testattiin [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA:n ja [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTANOCin analytiikassa rinnakkain HUS-kuvantamisen validoidun menetelmän kanssa. Molemmalla menetelmällä määritettiin eri-ikäisten  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden radiokemiallisia puhtauksia ja rinnakkaisista tuloksista laskettiin erotukset, keskiarvot ja keskihajonnat. Menetelmien yhdenmukaisuutta tarkasteltiin Bland JM *et al* (1986)<sup>79</sup> menetelmän mukaisesti esittämällä erotukset keskiarvojen funktiona pistekaaviossa (kuva 23). Pistejoukon ylä- ja alarajaksi asetettiin kaksinkertaiset keskihajonnat  $\pm 2D$ .



**Kuva 23.** ROTOP QC-iTLC -laadunvalvontasetin ja HUS-laboratorion menetelmällä määritettyinä [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA ja -DOTA-NOC -näytteiden radiokemiallisten puhtauksien erotukset keskiarvojen funktiona.

Tuloksissa suurin ero menetelmien avulla saatujen radiokemiallisten puhtauksien välillä oli 0,5 %, mikä kertoo, että menetelmät ovat hyvin yhdenmukaisia. Mittaustuloksien hajonnan ja vähäisyyden takia olisi kuitenkin tarvittu enemmän toistoja, mutta se ei ollut mahdollista  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden saatavuuden takia. Näytetilavuuksien 1  $\mu\text{L}$  ja 2  $\mu\text{L}$  aktiivisuusjakaumat 1x9 cm iTLC-SG-levyillä tutkittiin autoradiografialla ja tulokset ovat esitetty kuvassa 24.



**Kuva 24.** [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-näytetilavuuksien 1  $\mu\text{L}$  (A) ja 2  $\mu\text{L}$  (B) aktiivisuusjakaumat 1x9 cm iTLC-SG-levyillä. Levyn A kolloidien osuus on 0,9 % ja levyn B kolloidien osuus on 0,7 %

Kuvasta 24 huomataan, että näytetilavuuksilla 1 µL ja 2 µL tulos erosi 0,2 %, joten ero ei ollut merkittävä. Tällöin näytetilavuuden 2 µL käyttö oli sopivaa. Laadunvalvontasetin käytössä oli lukuisia käytännön etuja validoituun menetelmään nähden. Laadunvalvontasetillä liuosrintaman nousuaika lyheni yhdeksästä minuutista neljään minuuttiin, TLC-levyä ja ajoliuosta kului vähemmän, muodostui vähemmän jätettä ja laitteisto vei vähemmän tilaa vetokaapista.

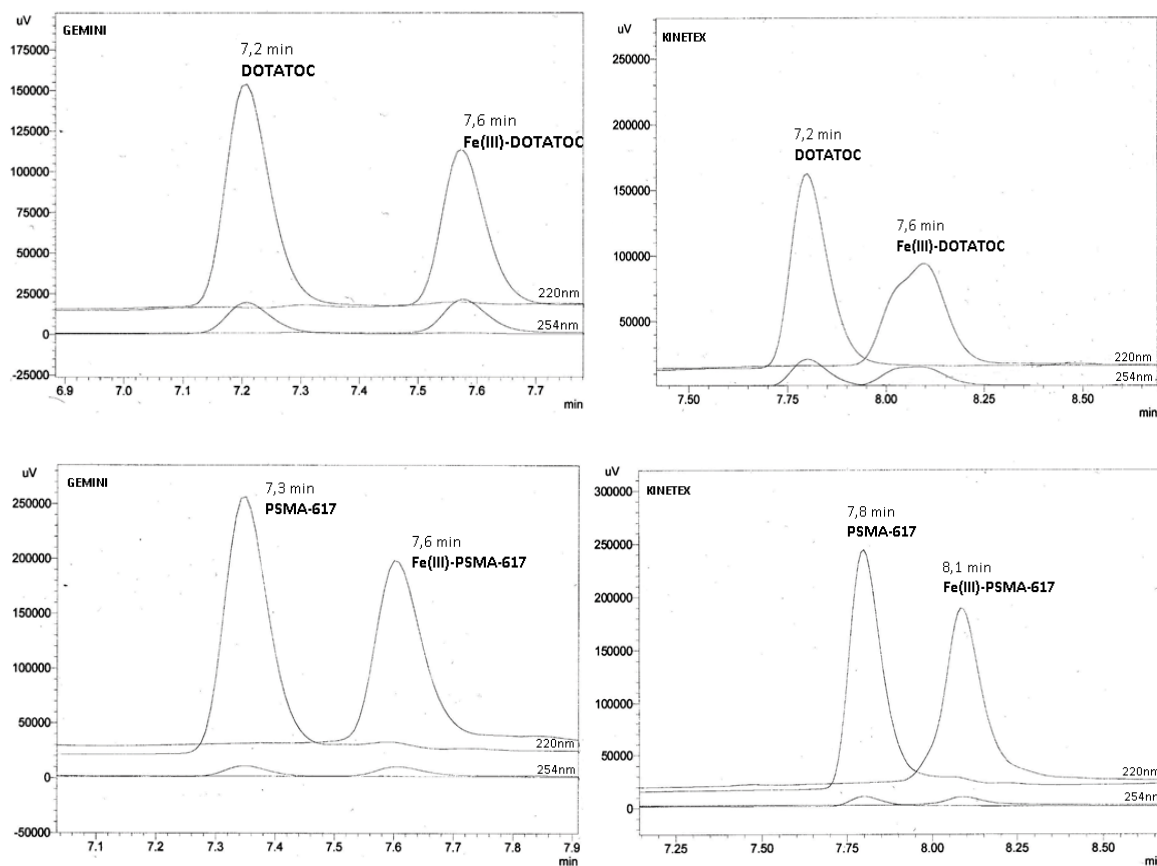
## 7.2 Metallikontaminaatiot

### 7.2.1 Rauta(III)kontaminaation vaikutus radiolääkkeiden retentioaikaan

HPLC-laitteella mitattujen näytteiden tulokset analysoitiin LabSolution - ohjelmalla. Raudalla leimattujen ja leimaamattomien peptidien kuvaajista rajattiin pohjaviivasta erottuvat piikit ja luettiin yhdisteiden retentioajat. Raudalla leimattujen peptidien retentioajat olivat pidempiä kuin leimaamattomilla peptideilla. Gemini-kolonnilla retentioajat pidentyivät 0,3-0,9 minuuttia ja Kinetex-kolonnilla retentioajat pidentyivät 0,3-1,2 minuuttia. PSMA-617:n ja DOTATOCin kohdalla erotustekijät kolonnien välillä olivat hyvin lähellä toisiaan. PSMA-11:n mittauksissa kolonnien välillä oli selvempää eroa. DOTANOCin mittauksissa oli käytetty eri gradientteja kolonnien välillä, joten erotustekijät eivät olleet vertailukelpoisia.

Kuvassa 25 on esitetty kromatogrammit DOTATOCin ja PSMA-617:n leimautumisesta Fe(III):lla sekä Gemini- että Kinetex-kolonnia käyttäen. Taulukossa 13 on esitetty eri peptidien retentioajat ja mittauksissa käytetyt HPLC-gradientit.





Kuva 25. DOTATOCin ja PSMA-617:n leimautuminen Fe(III):lla sekä Gemini- että Kinetex-kolonnilla käyttäen. Ylhäällä Dotanocin leimautuminen Fe(III):lla Gemini-kolonnilla (vasen) ja Kinetex-kolonnilla (oikea) tutkittuna. Alhaalla PSMA-617:n leimautuminen Fe(III):lla Gemini-kolonnilla (vasen) ja Kinetex-kolonnilla (oikea) tutkittuna

Taulukko 13. Fe(III)-leimauksissa mitattujen näytteiden HPLC-gradientit ja retentioajat. Gradientit ovat numeroitu kuvan 11 gradienttien mukaan.

Yhdiste	Kolonne	Leimaamattoman yhdisteen retentioaika (min)	FeCl leimatun yhdisteen retentioaika (min)	Gradientti	Erotustekijä $\alpha$
DOTANOC	Gemini	5,7	6,6	7	1,17
	Kinetex evo	8,6	8,9	6	1,03
PSMA-11	Gemini	6,7	7,3	6	1,09
	Kinetex evo	6,5	7,7	6	1,19
DOTATOC	Gemini	7,2	7,6	4	1,05
	Kinetex evo	7,8	8,1	4	1,04
PSMA-617	Gemini	7,3	7,6	1	1,03
	Kinetex evo	7,8	8,1	1	1,04

## **8. Pohdinta ja johtopäätökset**

Työssä saavutettiin tavoitteet 1-6 (sivu 31) melko hyvin. Ongelmallisin tekijä oli radiolääkkeiden ajoittainen huono saatavuus ja siitä johtuva toistojen vähäinen määrä osassa mittauksista. Alla on esitetty tavoitteiden 1-6 toteutuminen ja johtopäätökset:

### **1. HPLC-menetelmän kehitys [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617-radiolääkkeelle**

[<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617:lle saatiin kehitettyä sopiva HPLC-menetelmä, jolla retentioajaksi tuli 7,4 minuuttia ja mittauksen kokonaiskesto oli 15 minuuttia. Koska [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-näytteet olivat valmiiksi laimennettuna ja niiden saatavuus oli huono, ei piikin muodon suhteen pystynyt tekemään tarkkaa analyysiä. Täten HPLC-menetelmän käyttäminen [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617:n laadunvalvonnassa edellyttäisi vielä lisää tuloksia tuoreilla [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617-näytteillä, joissa laimennokset olisivat pienemmät. Mitatut [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-näytteet eivät häntineet (häntimistekijä 0,92), mutta PSMA-617-lähtöaineen kanssa häntimistekijä oli maksimissaan 1,42. PSMA-617-lähtöaineen tapauksessa häntiminen saattoi kuitenkin johtua liian suuresta näytepitoisuudesta, koska käytetyt pitoisuudet olivat maksimissaan viisinkertaiset potilasannosten pitoisuuksiin nähden. Riekkola M-L. ja Hyötyläinen T. (2000) mukaan liian suuri näytepitoisuus saa aikaan häntiviä piikkejä, koska kolonnin retentiopaikat täyttyvät ja näytemolekyyliä ei pystytä pidättämään kapeiksi vyöhykkeiksi.<sup>67</sup> Häntimistekijän arvo 1,42 on kuitenkin melko pieni sillä Dolan W. J.(2003) mukaan työssä, missä käytetään oikeita näytteitä, on yleistä, että pyritään >1,5 häntimistekijään, mutta voidaan tyytyä jopa häntimistekijän arvoon >2.<sup>69</sup>

### **2. PSMA-617-peptidille massakvantitointi kehitetyllä HPLC-menetelmällä**

HPLC-menetelmän avulla tehtiin PSMA-617-refenssille massakvantitointisuora, jonka avulla voidaan määrittää tuotteesta [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617-radiolääkkeen ainemäärä ja PSMA-617-lähtöaineen pitoisuus. Siitä huolimatta, että pienimpien pitoisuuksien tuloksissa oli huomattavissa hajontaa, saatiin pistejoukon lineaarisovitukselle erittäin hyvä korrelaatiokerroin (0,9978). Tämän lisäksi tuotteiden laadunvalvonnassa lähtöaineen pitoisuuden tulee alittaa tietty raja-arvo ja menetelmän lineaariuus kokeiden alimmilla pitoisuuksilla ei ole tällöin kovin merkittävää.

### **3. $^{177}\text{Lu}$ :n gammaspektrin määrittäminen Hidex-gammalaskurilla**

$^{177}\text{Lu}$ :n gammaspektriä määritettiin sairaalan Hidex-gammalaskurilla ja tutkittiin, löytyykö eroja kantajallisen ja kantajavapaan merkkiaineen välillä. Tulos oli alkuoletuksen mukainen ja eroja spektrien välillä ei havaittu. Lutetium-177:n tunnistamisen kannalta oleelliset karakteristiset gammapiikit olivat kuitenkin havaittavissa selvästi ja gammaspektriä voidaan hyödyntää säteilyn tunnistamisessa, mikäli epäillään  $^{177}\text{Lu}$ -kontaminaatiota sairaalan tiloissa.

### **4. TLC-menetelmien yhtenäistäminen ja mittausparametrien optimointi $^{177}\text{Lu}$ - ja $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvonnassa**

TLC-kokeissa, joissa tutkittiin  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden avulla skannausnopeuden ja -jännitteen vaikutusta laadunvalvonnassa, havaittiin, että hitaimmalla testatulla skannausnopeudella, 0,5 mm/s, ei ollut tuoreiden (51,4 kBq/2  $\mu\text{L}$  – 241,9 kBq/2  $\mu\text{L}$ ) näytteiden kannalta merkittävää etua skannausnopeuteen 1 mm/s nähden. Tällöin 1mm/s skannausnopeuden käyttö on hyödyllisempää, sillä se nopeuttaa laadunvalvontaa puolittamalla skannausajan. Matala-aktiivisten näytteiden kanssa skannausnopeuden 0,5 mm/s edut korostuvat kuitenkin selvästi. Skannausnopeudet 1,5 mm/s ja 2 mm/s hylättiin, koska laitteiston mittaustarkkuus heikkeni huomattavasti.

Skannausjännitteen vaikutus näkyi selvästi TLC-menetelmässä mitattaessa  $^{68}\text{Ga}$ -näytteitä. Jännitteellä 900 V saatiin suurimmat pulssimäärät odotusten mukaisesti, mutta myös parhaimmat S/N-arvot. Jännitteellä 900 V määritettiin alhaisimmat TLC-skannauksen herkkyysrajat: 1,72 kBq skannausnopeudella 1 mm/s ja 1,96 kBq skannausnopeudella 0,5 mm/s. Herkkyysrajat eivät olleet tarpeeksi alhaiset, mikä viittaa siihen, ettei TLC-skanneri, SR-1B, LabLogic, soveltuisi  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvontaa varten. Tulos kuitenkin kyseenalaistuu sen takia, että lineaarisovituksesta poiketen herkkyysrajat näyttäisivät matala-aktiivisten näytteiden perusteella olevan huomattavasti matalammat: ~600 Bq skannausjännitteellä 900 V, ~780 Bq skannausjännitteellä 850 V ja ~870 Bq skannausjännitteellä 800 V. Tämän takia matala-aktiivisilla  $^{68}\text{Ga}$ -näytteillä tulisi tehdä lisää kokeita ja selvittää S/N-arvon käyttäytymistä.

TLC-kokeissa tutkittiin myös ajoliuoksen vahvuuden vaikutusta. Tuloksena saatiin, että menetelmät olivat hyvin yhdenmukaiset, kunhan näytteen aktiivisuudet olivat laitteiston herkkyysrajan yläpuolella. Menetelmien yhdenmukaisuuden takia 1 M ammoniumasetaatti-MeOH-ajoliuosta voidaan käyttää myös  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden laadunvalvonnassa. Samojen ajoliuosten käyttö helpottaa myös laadunvalvontatyöskentelyä, sillä erilaisia liuosten määriä vähentyy ja reagensseja kuluu vähemmän 1 M liuoksen valmistamisessa.

## **5. ROTOP QC-ITLC-laadunvalvontasetin soveltuminen radiolääkkeiden laadunvalvontaan**

$^{68}\text{Ga}$ ]-Ga-PSMA:n ja  $^{68}\text{Ga}$ ]-Ga-DOTANOCin analytiikassa testattiin HUS-kuvantamisen validoidun TLC-menetelmän kanssa rinnakkain ROTOP QC-iTLC -laadunvalvontasettiä. Menetelmät vaikuttivat yhdenmukaisilta, sillä niiden avulla saatujen radiokemiallisten puhtauksien välillä oli eroa suurimmillaan vain 0,5 %. Mittaustuloksiin ei kuitenkaan saatu tarvittavaa määrää toistoja, joten menetelmien yhdenmukaisuutta ei voida määrittää ilman lisäkokeita. Mikäli laadunvalvontasetillä päästään samaan tarkkuuteen kuin validoidulla menetelmällä, on sen käytössä lukuisia käytännön etuja. Laadunvalvontasetillä TLC-menetelmä nopeutui noin viidellä minuutilla, ja lisäksi TLC-levy ja ajoliuosta kului vähemmän, jolloin myös radioaktiivista jätettä muodostuu vähemmän. QC-iTLC -setin TLC-laitteisto vei lisäksi vähemmän tilaa vetokaapista, mikä tekee työskentelystä helpompaa ja turvallisempaa.

## **6. Fe(III)-kontaminaatioiden vaikutus $^{177}\text{Lu}$ - ja $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden retentioaikoihin HPLC-menetelmässä**

Tutkimuksessa tutkittiin myös rauta(III)kontaminaation vaikutusta  $^{177}\text{Lu}$ - ja  $^{68}\text{Ga}$ -radiolääkkeiden valmistukseen, sillä rauta voi olla yksi syy epäpuhtauksiin, joita on havaittu DOTA-peptidien UV-kromatogrammeissa. Kokeissa rauta leimasi DOTA-peptidit ja pidensi niiden retentioaikaa HPLC-menetelmässä. Tuloksia voidaan käyttää epäpuhtauspiikkien tunnistuksessa kliinisessä lääkevalmistuksessa, mikäli käytetään samoja mittaolosuhteita ja -asetuksia.

Raudalla leimaantuneiden DOTA-peptidien piikit saatiin molemmilla kolonneilla (Gemini ja Kinetex) erottumaan. Kinetex-kolonnilla piikit olivat leveämpiä ja osittain päällekkäisiä leimaamattoman DOTA-peptidin piikkien kanssa. Kinetex-kolonnilla on kuitenkin parempi erotustehokkuus, joten on mahdollista, että piikin leveneminen oli seurausta erilaisten metalli-DOTA-peptidien erottumisesta. Eri metalleja tulee muun muassa aineiden valmistuksessa käytetyistä liuoksista, lasista, generaattorista ja muista välineistä.

## 9. Kirjallisuus

- (1) Speer, T.W. *Targeted Radionuclide Therapy*; Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- (2) Hoskin, P.J. *Radiotherapy in Practice - Radioisotope Therapy*; OUP Oxford, 2007.
- (3) Korpela, H. *Teoksessa Säteilyn Käyttö*; Säteilyturvakeskus: Hämeenlinna, 2004.
- (4) Baum, R. P.; Kulkarni, H. R. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics* **2012**, 2 (5), 437–447.
- (5) Giordano, C.; Marchiò, M.; Timofeeva, E.; Biagini, G. Neuroactive Peptides as Putative Mediators of Antiepileptic Ketogenic Diets. *Front. Neurol.* **2014**, 5, 63.
- (6) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions. *Drug Discov. Today* **2015**, 20 (1), 122–128.
- (7) Hancock, R. E. W.; Sahl, H.-G. Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies. *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24 (12), 1551–1557.
- (8) Manning, M. C.; Chou, D. K.; Murphy, B. M.; Payne, R. W.; Katayama, D. S. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm. Res.* **2010**, 27 (4), 544–575.
- (9) Kratochwil, C.; Giesel, F. L.; Stefanova, M.; Benešová, M.; Bronzel, M.; Afshar-Oromieh, A.; Mier, W.; Eder, M.; Kopka, K.; Haberkorn, U. PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with <sup>177</sup>Lu-Labeled PSMA-617. *J. Nucl. Med.* **2016**, 57 (8), 1170–1176.
- (10) Sosabowski, J. K. Conjugation of DOTA-like Chelating Agents to Peptides and Radiolabeling with Trivalent Metallic Isotopes. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (2), 972–976.
- (11) Breeman, W. A. P.; de Blois, E.; Sze Chan, H.; Konijnenberg, M.; Kwekkeboom, D. J.; Krenning, E. P. <sup>68</sup>Ga-Labeled DOTA-Peptides and <sup>68</sup>Ga-Labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives. *Semin. Nucl. Med.* **2011**, 41 (4), 314–321.
- (12) Frimpong, E.; Skelton, A. A.; Honarparvar, B. DFT Study of the Interaction between DOTA Chelator and Competitive Alkali Metal Ions. *J. Mol. Graph. Model.* **2017**, 76, 70–76.
- (13) Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubiček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P. Complexation of Metal Ions with TRAP (1,4,7-Triazacyclononane Phosphinic Acid) Ligands and 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-Triacetic Acid: Phosphinate-Containing Ligands as Unique Chelators for Trivalent Gallium. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (1), 577–590.
- (14) Fani, M.; André, J. P.; Maecke, H. R. <sup>68</sup>Ga-PET: A Powerful Generator-based Alternative to Cyclotron-based PET Radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. Imaging* **2008**, 3 (2), 53–63.
- (15) Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Semin. Nucl. Med.* **2016**, 46 (5), 373–394.
- (16) Watanabe, S.; Hashimoto, K.; Ishioka, N. S. Lutetium-177 Complexation of DOTA and DTPA in the Presence of Competing Metals. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2015**, 303 (2), 1519–1521.

- (17) Kang, C. S.; Chen, Y.; Lee, H.; Liu, D.; Sun, X.; Kweon, J.; Lewis, M. R.; Chong, H.-S. Synthesis and Evaluation of a New Bifunctional NETA Chelate for Molecular Targeted Radiotherapy Using(90)Y or(177)Lu. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (3), 242–249.
- (18) Bailey, G. A.; Price, E. W.; Zeglis, B. M.; Ferreira, C. L.; Boros, E.; Lacasse, M. J.; Patrick, B. O.; Lewis, J. S.; Adam, M. J.; Orvig, C. H2azapa: A Versatile Acyclic Multifunctional Chelator for 67Ga, 64Cu, 111In, and 177Lu. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (22), 12575–12589.
- (19) Wängberg, B.; Nilsson, O.; Johanson, V.; Kölbj, L.; Forssell-Aronsson, E.; Andersson, P.; Fjälling, M.; Tisell, L.-E.; Ahlman, H. Somatostatin Receptors in the Diagnosis and Therapy of Neuroendocrine Tumors. *The Oncologist* **1997**, *2* (1), 50–58.
- (20) Ambrosini, V.; Campana, D.; Tomassetti, P.; Grassetto, G.; Rubello, D.; Fanti, S. PET/CT with 68Gallium-DOTA-Peptides in NET: An Overview. *Eur. J. Radiol.* **2011**, *80* (2), e116–e119.
- (21) Wild, D.; Schmitt, J. S.; Ginj, M.; Mäcke, H. R.; Bernard, B. F.; Krenning, E.; De Jong, M.; Wenger, S.; Reubi, J.-C. DOTA-NOC, a High-Affinity Ligand of Somatostatin Receptor Subtypes 2, 3 and 5 for Labelling with Various Radiometals. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (10), 1338–1347.
- (22) Antunes, P.; Ginj, M.; Zhang, H.; Waser, B.; Baum, R. P.; Reubi, J. C.; Maecke, H. Are Radiogallium-Labelled DOTA-Conjugated Somatostatin Analogues Superior to Those Labelled with Other Radiometals? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34* (7), 982–993.
- (23) Pettinato, C.; Sarnelli, A.; Donna, M. D.; Civollani, S.; Nanni, C.; Montini, G.; Pierro, D. D.; Ferrari, M.; Marengo, M.; Bergamini, C. 68Ga-DOTANOC: Biodistribution and Dosimetry in Patients Affected by Neuroendocrine Tumors. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35* (1), 72–79.
- (24) Fani, M.; Nicolas, G. P.; Wild, D. Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2017**, *58* (Suppl 2), 61S-66S.
- (25) Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kratochwil, C.; Benesova, M.; Eder, M.; Neels, O. C.; Eisenhut, M.; Kübler, W.; Holland-Letz, T.; Giesel, F. L.; et al. The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (11), 1697–1705.
- (26) Kratochwil, C.; Afshar-Oromieh, A.; Kopka, K.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L. Current Status of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeting in Nuclear Medicine: Clinical Translation of Chelator Containing Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands Into Diagnostics and Therapy for Prostate Cancer. *Semin. Nucl. Med.* **2016**, *46* (5), 405–418.
- (27) Maurer, T.; Eiber, M.; Schwaiger, M.; Gschwend, J. E. Current Use of PSMA–PET in Prostate Cancer Management. *Nat. Rev. Urol.* **2016**, *13* (4), 226–235.
- (28) Eder, M.; Neels, O.; Müller, M.; Bauder-Wüst, U.; Remde, Y.; Schäfer, M.; Hennrich, U.; Eisenhut, M.; Afshar-Oromieh, A.; Haberkorn, U.; Kopka, K., Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharm. Basel Switz.* **2014**, *7* (7), 779–796.
- (29) Albert, R.; Krenning, E.P.; Lamberts, S.W.J. Menetelmä Farmaseuttisesta Käyttökelpoisen Radionuklidin Kanssa Kompleksoidun Ligandin Valmistamiseksi. FI101967B, 11.7.1994.
- (30) Malik, N.; Baur, B.; Winter, G.; Reske, S. N.; Beer, A. J.; Solbach, C. Radiofluorination of PSMA-HBED via Al18F2+ Chelation and Biological Evaluations In Vitro. *Mol. Imaging Biol.* **2015**, *17* (6), 777–785.
- (31) Zöllner, M.; Schuhmacher, J.; Reed, J.; Maier-Borst, W.; Matzku, S. Establishment and Characterization of Monoclonal Antibodies Against an Octahedral Gallium Chelate Suitable for Immunoscintigraphy with PET. *J. Nucl. Med.* **1992**, *33* (7), 1366–1372.
- (32) Eppard, E.; de la Fuente, A.; Benešová, M.; Khawar, A.; Bundschuh, R. A.; Gärtner, F. C.; Kreppel, B.; Kopka, K.; Essler, M.; Rösch, F. Clinical Translation and First In-Human Use of

- [44Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Theranostics* **2017**, 7 (18), 4359–4369.
- (33) Green, M. A.; Welch, M. J. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* **1989**, 16 (5), 435–448.
  - (34) Arinc, A.; Bé, M.-M.; Browne, E.; Chechev, V. P.; Chisté, V.; Galán, M.; Huang, X.; Kondev, F. G.; Luca, A.; Mougeot, X.; Nichols, A., Table of Radionuclides. LNE-LNHB/CEA July 4, 2012.
  - (35) Cho, Y. I.; Kim, J. M.; Kim, J. H. OCULAR ORGAN DOSE ASSESSMENT OF NUCLEAR MEDICINE WORKERS HANDLING DIAGNOSTIC RADIONUCLIDES. *Radiat. Prot. Dosimetry* **2017**, 175 (2), 209–216.
  - (36) de Blois, E.; Sze Chan, H.; Naidoo, C.; Prince, D.; Krenning, E. P.; Breeman, W. A. P. Characteristics of SnO<sub>2</sub>-Based <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga Generator and Aspects of Radiolabelling DOTA-Peptides. *Appl. Radiat. Isot.* **2011**, 69 (2), 308–315.
  - (37) Breeman, W.; de Jong, M.; Blois, E.; F Bernard, B.; Konijnenberg, M.; Krenning, E. Radiolabelling DOTA-Peptides with Ga-68. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, 32, 478–485.
  - (38) Decristoforo, C. a; Knopp, R. b; von Guggenberg, E. a; Rupprich, M. a; Dreger, T. b; Hess, A. b; Virgolini, I. a; Haubner, R. a. A Fully Automated Synthesis for the Preparation of <sup>68</sup>Ga-Labelled Peptides. *Nucl. Med. Commun.* **2007**, 28 (11), 870–875.
  - (39) Laine J., Kuhmonen V., Lipponen T., Bergström K. Experience in Changing to Cassette System in Ga-68 DOTANOC Routine Radiosynthesis. Department of Clinical Physiology and Nuclear Medicine, Helsinki University Central Hospital, HUS Medical Imaging Center, EANM konferenssi, Göteborg 10.-22.10 2014.
  - (40) Eckert & Ziegler Eurotope GmbH. User Manual for Synthesis of <sup>68</sup>Ga-Conjugated Peptides with PharmTracer Fractionation and Pre-Purification by Cation Exchange. 11.6.2014.
  - (41) Emmett, L.; Willowson, K.; Violet, J.; Shin, J.; Blanksby, A.; Lee, J. Lutetium 177 PSMA Radionuclide Therapy for Men with Prostate Cancer: A Review of the Current Literature and Discussion of Practical Aspects of Therapy. *J. Med. Radiat. Sci.* **2017**, 64 (1), 52–60.
  - (42) Dash, A.; Pillai, M. R. A.; Knapp, F. F. Production of <sup>177</sup>Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, 49 (2), 85–107.
  - (43) Pillai, M. R. A.; Chakraborty, S.; Das, T.; Venkatesh, M.; Ramamoorthy, N. Production Logistics of <sup>177</sup>Lu for Radionuclide Therapy. *Appl. Radiat. Isot.* **2003**, 59 (2), 109–118.
  - (44) Zaknun, J. J.; Bodei, L.; Mueller-Brand, J.; Pavel, M. E.; Baum, R. P.; Hörsch, D.; O'Dorisio, M. S.; O'Dorisio, T. M.; Howe, J. R.; Cremonesi, M.; et al. The Joint IAEA, EANM, and SNMMI Practical Guidance on Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) in Neuroendocrine Tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2013**, 40 (5), 800–816.
  - (45) Banerjee, S.; Pillai, M. R. A.; Knapp, F. F. R. Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (8), 2934–2974.
  - (46) Fendler, W. P.; Rahbar, K.; Herrmann, K.; Kratochwil, C.; Eiber, M. (<sup>177</sup>)Lu-PSMA Radioligand Therapy for Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2017**, 58 (8), 1196–1200.
  - (47) Kulkarni, H. R.; Singh, A.; Schuchardt, C.; Niepsch, K.; Sayeg, M.; Leshch, Y.; Wester, H.-J.; Baum, R. P. PSMA-Based Radioligand Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The Bad Berka Experience Since 2013. *J. Nucl. Med.* **2016**, 57 (Supplement 3), 97–104.
  - (48) Ahmadzadehfar, H.; Rahbar, K.; Kürpig, S.; Bögemann, M.; Claesener, M.; Eppard, E.; Gärtner, F.; Rogenhofer, S.; Schäfers, M.; Essler, M. Early Side Effects and First Results of Radioligand Therapy with <sup>177</sup>Lu-DKFZ-617 PSMA of Castrate-Resistant Metastatic Prostate Cancer: A Two-Centre Study. *EJNMMI Res.* **2015**, 5, 36.

- (49) Attard, G.; Parker, C.; Eeles, R. A.; Schröder, F.; Tomlins, S. A.; Tannock, I.; Drake, C. G.; de Bono, J. S. Prostate Cancer. *The Lancet* **2016**, *387* (10013), 70–82.
- (50) Virgolini, I.; Decristoforo, C.; Haug, A.; Fanti, S.; Uprimny, C. Current Status of Theranostics in Prostate Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, 1–25.
- (51) World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* **2013**, *310* (20), 2191–2194.
- (52) Delker, A.; Fendler, W. P.; Kratochwil, C.; Brunegraf, A.; Gosewisch, A.; Gildehaus, F. J.; Tritschler, S.; Stief, C. G.; Kopka, K.; Haberkorn, U.; Bartenstein, P.; Böning, G., Dosimetry for <sup>177</sup>Lu-DKFZ-PSMA-617: A New Radiopharmaceutical for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *43* (1), 42–51.
- (53) Heck, M. M.; Retz, M.; D'Alessandria, C.; Rauscher, I.; Scheidhauer, K.; Maurer, T.; Storz, E.; Janssen, F.; Schottelius, M.; Wester, H.-J.; Gschwend, J.E.; Schwaiger, M.; Tauber, R.; Eiber, M., Systemic Radioligand Therapy with <sup>177</sup>Lu Labeled Prostate Specific Membrane Antigen Ligand for Imaging and Therapy in Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *J. Urol.* **2016**, *196* (2), 382–391.
- (54) Weineisen, M.; Schottelius, M.; Simecek, J.; Baum, R. P.; Yildiz, A.; Beykan, S.; Kulkarni, H. R.; Lassmann, M.; Klette, I.; Eiber, M.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J., <sup>68</sup>Ga- and <sup>177</sup>Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56* (8), 1169–1176.
- (55) Yadav, M. P.; Ballal, S.; Tripathi, M.; Damle, N. A.; Sahoo, R. K.; Seth, A.; Bal, C. <sup>177</sup>Lu-DKFZ-PSMA-617 Therapy in Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: Safety, Efficacy, and Quality of Life Assessment. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (1), 81–91.
- (56) Scarpa, L.; Buxbaum, S.; Kendler, D.; Fink, K.; Bektic, J.; Gruber, L.; Decristoforo, C.; Uprimny, C.; Lukas, P.; Horninger, W.; Virgolini, I., The <sup>68</sup>Ga/<sup>177</sup>Lu Theragnostic Concept in PSMA Targeting of Castration-Resistant Prostate Cancer: Correlation of SUVmax Values and Absorbed Dose Estimates. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44* (5), 788–800.
- (57) Balk, S. P.; Ko, Y.-J.; Bubley, G. J. Biology of Prostate-Specific Antigen. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21* (2), 383–391.
- (58) Rahbar, K.; Ahmadzadehfar, H.; Kratochwil, C.; Haberkorn, U.; Schäfers, M.; Essler, M.; Baum, R. P.; Kulkarni, H. R.; Schmidt, M.; Drzezga, A.; Bartenstein, P.; Pfestroff, A.; Luster, M.; Lutzen, U.; Marx, M.; Prasad, V.; Brenner, W.; Heinzl, A.; Mottaghy, F.; Ruf, J.; Meyer, P.; Heusckel, M.; Eveslage, M.; Bögemann, M.; Fendler, W.; Krause, B., German Multicenter Study Investigating <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (1), 85–90.
- (59) Baum, R. P.; Kulkarni, H. R.; Schuchardt, C.; Singh, A.; Wirtz, M.; Wiessalla, S.; Schottelius, M.; Mueller, D.; Klette, I.; Wester, H.-J. <sup>177</sup>Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57* (7), 1006–1013.
- (60) Kristensen, K.; Agency, I. A. E. *Preparation and Control of Radiopharmaceuticals in Hospitals: A Guidebook*; International Atomic Energy Agency, 1979.
- (61) Stelmach, H. A.; Quinn, J. L. Radiopharmaceutical Quality Control. *Semin. Nucl. Med.* **1974**, *4* (3), 295–303.
- (62) GALLIUM (<sup>68</sup>Ga) EDOTREOTIDE INJECTION. EUROPEAN PHARMACOPEIA 9.0 tammikuu, 2013.
- (63) Euroopan Neuvosto. Euroopan Farmakopea, 9. Painos. Strasbourg 2017.
- (64) Saha, G. B. Quality Control of Radiopharmaceuticals. In *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*; Springer, New York, NY, 1992; pp 143–167.
- (65) Braithwaite, A. *Chromatographic Methods*; Springer Science & Business Media, 2012.
- (66) Knoll, G. F. *Radiation Detection and Measurement*, 4. painos.; Wiley: Hoboken, N.J., 2010.



- (67) Riekkola, M.-L.; Hyötyläinen, T. *Kolonnikromatografia Ja Kapillaarielektromigraatiotekniikat*; Helsingin Yliopisto: Helsinki, 2000.
- (68) Hayes, R.; Ahmed, A.; Edge, T.; Zhang, H. Core-shell Particles: Preparation, Fundamentals and Applications in High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1357*, 36–52.
- (69) Dolan, J. W. Why Do Peaks Tail? *LC GC N. Am. North Olmsted* **2003**, *21* (7), 612.
- (70) Nanabala, R.; Sasikumar, A.; Joy, A.; Pillai, M. R. A. Preparation of [<sup>177</sup>Lu]PSMA-617 Using Carrier Added (CA) <sup>177</sup>Lu for Radionuclide Therapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med. Radiat. Ther.* **2016**, *7* (5), 1–7.
- (71) Khalil, M. M. *Basic Science of PET Imaging*; Springer, 2016.
- (72) Breeman, W.; Blois, E.; Bakker, W.; Krenning, E. Radiolabeling DOTA-Peptides with <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu to a High Specific Activity; 2006; pp 119–125.
- (73) Asti, M.; Tegoni, M.; Farioli, D.; Iori, M.; Guidotti, C.; Cutler, C. S.; Mayer, P.; Versari, A.; Salvo, D. Influence of Cations on the Complexation Yield of DOTATATE with Yttrium and Lutetium: A Perspective Study for Enhancing the <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu Labeling Conditions. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39* (4), 509–517.
- (74) Euroopan Farmakopea, 9. Painos, Lutetium(<sup>177</sup>Lu)Liuos Radioaktiiviseen Leimaukseen. Euroopan Neuvosto July 2017.
- (75) Oehlke, E.; Le, V. S.; Lengkeek, N.; Pellegrini, P.; Jackson, T.; Greguric, I.; Weiner, R. Influence of Metal Ions on the <sup>68</sup>Ga-Labeling of DOTATATE. *Appl. Radiat. Isot.* **2013**, *82* (Supplement C), 232–238.
- (76) Das, T.; Guleria, M.; Parab, A.; Kale, C.; Shah, H.; Sarma, H. D.; Lele, V. R.; Banerjee, S. Clinical Translation of <sup>177</sup>Lu-Labeled PSMA-617: Initial Experience in Prostate Cancer Patients. *Nucl. Med. Biol.* **2016**, *43* (5), 296–302.
- (77) MAP Medical Technologies Oy. Lutetium(Lu-177)-PSMA-617-Injektionesteen Laatuvaatimukset. April 2016.
- (78) Kurmaev, E. Z.; Shamin, S. N.; Kolobova, K. M.; Shulepov, S. V. X-Ray Emission Spectra of Carbon Materials. *Carbon* **1986**, *24* (3), 249–253.
- (79) Bland, J. M.; Altman, D. G. Statistical Methods for Assessing Agreement between Two Methods of Clinical Measurement. *Int. J. Nurs. Stud.* **2010**, *47* (8), 931–936.

## 10. Liitteet

**Liite 1. HPLC-kokeissa [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA:lle ja PSMA-617-referenssille testatut gradientit ja niihin liittyvät huomiot. Gradientit numeroitu kuvan x mukaisesti.**

Näytteet	Injektio-tilavuus (μL)	Kolonne	Gradientti	Virtausnopeus (ml/min)	Huomiot
PSMA-617	10	Gemini	6	0,6	PSMA-617:n UV-piikki (10,1 min) oli kromatogrammissa gradientin muutoskohdassa ja siksi huonosti rajattavissa.
Lu-PSMA PSMA-617	5 10	Gemini	4	0,6	Lu-PSMA:n ja PSMA-617:n UV-piikit (7,9 min, 8,0 min) olivat kromatogrammissa gradientin muutoskohdassa ja siksi huonosti rajattavissa. Radioaktiivisuuskromatogrammin piikki oli leveä alhaalta ja se oli ajanhetkellä 8,0 min.
Lu-PSMA PSMA-617	5 10	Gemini	5	0,6	Näytteiden UV-piikit (7,9 min) oli kromatogrammissa edelleen gradientin muutoskohdassa ja siksi huonosti rajattavissa. Radioaktiivisuuskromatogrammin piikki oli leveä tyvestä ja se oli ajanhetkellä 8,0 min.
Lu-PSMA PSMA-617	5 10	Gemini	3	0,6	Lu-PSMA:n UV-piikkiä oli vaikea havaita laimeasta näytteestä johtuen. PSMA-617:n UV-piikki oli 8,6 min kohdalla. Radioaktiivisuuskromatogrammin piikki oli terävä ja se oli ajanhetkellä 8,6 min.
Lu-PSMA PSMA-617	5 10	Gemini	2	0,6	Tuote eluoitui keskimäärin 8,5 min kohdalla. Radioaktiivisuuskromatogrammin piikki oli terävä ja se oli keskimäärin ajanhetkellä 8,6 min.
Lu-PSMA PSMA-617	5 10	Gemini	1	0,6	Tuote eluoitui keskimäärin 7,4 min kohdalla. Tuotteen suuresta laimennuksesta johtuen UV-piikki oli melko pieni, mutta havaittavissa. Radioaktiivisuuskromatogrammin piikki oli terävä ja se oli keskimäärin ajanhetkellä 7,5 min.
Lu-PSMA PSMA-617	5 10	Kinetex	1	0,45	Lu-PSMA:n UV-piikkiä oli vaikea havaita laimeasta näytteestä johtuen. PSMA-617:n UV-piikki oli 6,8 min kohdalla. Radioaktiivisuuskromatogrammin piikki oli alhaalta leveä ja se oli ajanhetkellä 6,5 min.